



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NEUROGÉNESE NO CÉREBRO ADULTO

Trabalho submetido por

Inês Machado Pureza Guerra

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Professora Doutora Evgenia Bekman

Dezembro de 2013

Agradecimentos

“I can no other answer make, but, thanks, and thanks.” – William Shakespeare.

À orientadora Professora Doutora Evgenia Bekman, por ter permitido explorar uma área que tanto aprecio. Pelo conhecimento transmitido, pelos conselhos e pelas opiniões partilhadas ao longo de todo o trabalho de mestrado. Ainda que separadas por fronteiras, agradeço a proximidade que mantivemos e o apoio recebido.

À Roche Diagnostics, em Mannheim, pela ilimitada fonte de pesquisa disponibilizada e às minhas colegas e amigas Doutora Julia Schilling e Gergana Krasteva pela motivação e pela amizade e compreensão que demonstraram desde o momento em que pisei terras germânicas.

Obrigado ao meu amor Rui Pedro por ser uma força inesgotável, acreditar no meu trabalho e, mesmo sendo artista de coração e alma, ouvir... ouvir que a neurogênese existe e que palavras esquisitas como girus denteado do hipocampo e oligodendrócitos têm um sentido. Pelo apoio e amor dados todos os dias.

Mas especialmente, muito obrigado aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram e me inspiraram a fazer e a ser melhor do que alguma vez pensei. Por toda a força que me deram, ao meu mano pela inspiração e pela sua alma livre, por acreditar sempre no melhor da irmã mais nova, à minha mãe pela alma mais bondosa que tive o privilégio de conhecer, por me permitir voar apesar de todas as preocupações que isso envolve. Um grande obrigado ao meu pai, que foi, é, e sempre será o meu maior mentor.

Obrigada por tudo.

Resumo

Ramón y Cajal escreveu, em 1928, que *“in the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended and immutable. Everything may die, nothing may be generated.”*. Este conceito tornou-se um dos principais dogmas da neurociência e, apesar de claras evidências o contestarem, a sua refutação veio a revelar-se uma tarefa imensamente árdua.

Em 1960, Joseph Altman foi o primeiro a objectar esta teoria. Este sugeriu a ocorrência da neurogénese em determinadas regiões do cérebro adulto. Mais tarde, Kaplan e Hinds confirmaram a existência de células estaminais neuronais (CEN) adultas. Apesar destas observações, diversos cientistas recusaram aceitar tal ideia revolucionária, o que levou a que apenas nos anos 90 se tenha eliminado por completo o há muito estabelecido dogma. A desmistificação da impossibilidade da geração de novos neurónios no cérebro adulto contribuiu para que a neurogénese no adulto se tornasse numa das temáticas mais estudadas da neurociência moderna.

Hoje, sabe-se que a neurogénese continua a ocorrer no cérebro adulto, sendo conhecida a produção de novos neurónios em duas regiões restritas, a zona subventricular (ZSV) e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) do hipocampo.

Este trabalho de mestrado incide nos mecanismos de formação das CEN adultas e nas regiões onde se processa a neurogénese. Os processos neurogénicos que ocorrem nos nichos, factores regulatórios e alterações fisiopatológicas do sistema nervoso central (SNC) são tomados em consideração. Desvendam-se alguns dos mistérios da linhagem celular mais recentemente identificada, as células NG2. Finalmente, são abordados os aspectos clínicos da neurogénese e é brevemente discutido o potencial terapêutico das células estaminais.

Palavras-Chave: Neurogénese adulta · Células estaminais neuronais · Glia radial · Nichos neurogénicos

Abstract

Rámon y Cajal wrote, in 1928, that *“in the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended and immutable. Everything may die, nothing may be generated”*. This concept became one of the main dogmas of neuroscience and, despite clear contrary evidences, its refutation has proved to be an arduous achievement.

The first who challenged this dogma was Joseph Altman in 1960s. He stated, that neurogenesis persists in restricted areas of the adult brain. Subsequently, Kaplan e Hinds confirmed the existence of adult neural stem cells. Despite these observations, several scientists refused acceptance of this revolutionary idea, causing this long lasting dogma to persist until the 90s. The demystification of the impossibility of new neurons generation in the adult brain made adult neurogenesis to become one of the most widely studied subjects in modern neuroscience.

Today, it is widely accepted that neurogenesis persists in the adult brain, with recognized production of new neurons in two restricted areas, the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus.

This master thesis focus on the formation mechanisms of adult neural stem cells (NSC) and the regions where neurogenesis occurs. Neurogenic processes within the niches, regulatory factors and pathophysiological changes of the central nervous system (CNS) are taken into consideration. Some of the mysteries of the most recently identified cell lineage, the NG2 cells, will be revealed. Lastly, clinical aspects of neurogenesis and an outlook on the therapeutical potential of neurogenesis are addressed.

Key Words: Adult neurogenesis · Neural stem cells · Radial glia · Neurogenic niches

Abstract

1928 schrieb Ramón y Cajal *“in the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended and immutable. Everything may die, nothing may be generated”*. Dieses Schlussfolgerung wurde zu einem der größten Dogmen der Neurowissenschaft und trotz gegenteiliger Beweisen wurde die Anfechtung dieser Theorie ein mühsames Unterfangen.

Der erste, der dieses Dogma in Frage stellte, war Joseph Altman in den 60er Jahren. Er vertrat die These, dass Neurogenese in eingeschränkten Bereichen des Gehirns von Erwachsenen fortbesteht. Darauf folgend wies Kaplan und Hinds die Existenz von adulten neuronalen Stammzellen nach. Trotz wissenschaftlicher Beweise, lehnten viele Experten die Existenz der Neurogenese bis in die 90er Jahre ab. Die Entmystifizierung der Unmöglichkeit, neue Neuronenzellen in einem adulten Gehirn zu generieren, führte dazu, dass die Neurogenese eins der meist erforschten Themen in der modernen Neurowissenschaft wurde.

Heutzutage herrscht weithin gehende Übereinstimmung, dass Neurogenese im adulten Gehirn in zwei abgegrenzten Bereichen – der Subventrikulärer Zone (SZV) und der Subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (DG) im Hippocampus stattfindet.

Diese Masterarbeit beschäftigt sich mit den Entstehungsmechanismen adulter neuraler Stammzellen (NCS) und den Bereichen des adulten Gehirns, in denen die Neurogenese stattfindet. Erörtert werden neurogene Prozesse, deren Einflussfaktoren und pathologische Veränderungen des zentralen Nervensystems (CNS). Dargestellt werden einige der Rätsel der neulich entdeckten Zelllinien, den NG2 Zellen. Der klinische Aspekt der Neurogenese bildet mit dem Ausblick auf das therapeutische Potential der Neurogenese den Abschluss dieser Arbeit.

Stichwörter: Adulte Neurogenese · Neurale Stammzellen · Radial glia · Neurogene Zellnischen

(página intencionalmente em branco)

Índice Geral

<i>Resumo</i>	3
<i>Índice Geral</i>	7
<i>Índice de Figuras</i>	10
<i>Lista de Abreviaturas</i>	11
<i>1. Introdução</i>	13
1.1. Organização Geral do Sistema Nervoso.....	13
1.2. Componentes Celulares do Sistema Nervoso.....	13
1.2.1. Neurónios	13
1.2.2. Neurotransmissores	15
1.2.3. Neuroglia	16
<i>2. Origem das Células Estaminais Neurais</i>	19
2.1. Glia Radial como fonte de Células Estaminais	20
2.1.1. De Células NE a Células GR.....	20
2.1.2. De GR a Astrócitos.....	22
2.2. Desenvolvimento Cerebral Pós-Natal	23
2.2.1. O que são as Células Estaminais?.....	23
2.2.2. Evolução das Células Estaminais	24
<i>3. Zonas Germinativas do Cérebro Adulto</i>	27
3.1. A Zona Subventricular	28
3.1.1. Formação da Zona Subventricular.....	28
3.1.2. Células Estaminais na Zona Subventricular	29
3.1.3. Astrócitos da Zona Subventricular como Células Estaminais.....	30
3.1.4. Organização da Zona Subventricular	30
3.1.5. Migração das Células para o Bulbo Olfatório	31
3.2. A Zona Subgranular	32
3.2.1. Células Estaminais da Zona Subgranular	32
3.2.2. Os Astrócitos e as Células D	32
3.3. Regiões não Neurogénicas	33
<i>4. A Glia NG2+ como Células Estaminais</i>	35

4.1.	Novo Grupo Neural	35
4.2.	Precursos Celulares de Oligodendrócitos.....	35
4.3.	Características especiais das Células NG2+.....	36
4.4.	Diferenciação das Células NG2 em Oligodendrócitos.....	36
4.5.	Células NG2+ em resposta à Dismielinização	37
4.6.	As Células NG2 originam Astrócitos e Neurónios?.....	37
5.	<i>Nichos Neurogénicos</i>	41
5.1.	Constituição dos Nichos Neurogénicos.....	41
5.1.1.	Células Ependimais	41
5.1.2.	Astrócitos.....	42
5.1.3.	Descendentes Imaturos das CEN e Neurónios Maduros	42
5.1.4.	Células Endoteliais	43
5.2.	Matriz Extracelular	43
5.3.	Nicho Vascular	43
6.	<i>Sinalização nos Nichos Neurogénicos</i>	45
6.1.	Factores Internos	45
6.1.1.	Via de Sinalização Sonic Hedgehog.....	45
6.1.2.	Proteínas Morfogénicas do Osso	46
6.1.3.	Via de Sinalização Wnt	46
6.1.4.	Via de Sinalização Notch	47
6.2.	Factores Externos	48
6.2.1.	Factor de Crescimento Endotelial Vascular	48
6.2.2.	Factores de Crescimento Epidermal e do Fibroblasto 2.....	49
6.2.3.	Factor Neurotrófico derivado do Cérebro	49
7.	<i>Neurogénese em Condições Patológicas</i>	51
7.1.	Doenças Psiquiátricas.....	51
7.1.1.	Neurogénese na Depressão.....	51
7.1.2.	Neurogénese na Esquizofrenia	53
7.1.3.	Causa ou Consequência?	54
7.2.	Neurogénese nas Doenças Neurodegenerativas.....	55
7.2.1.	Doença de Alzheimer	55
7.2.2.	Doença de Parkinson	56
7.2.3.	Neurgénese como Estratégia Terapêutica.....	57
8.	<i>Neurogénese como Alvo Terapêutico</i>	59

8.1. Estimulação de Populações Endógenas de Células Estaminais	59
8.2. Transplantação de Células Estaminais	61
9. <i>Considerações Finais</i>	63
<i>Bibliografia</i>	65

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura do Neurónio

Figura 2: Mecanismos das Sinapses Eléctricas e Químicas

Figura 3: Alterações do Neuroepitélio durante a Neurulação

Figura 4: Localização dos Ventrículos Laterais

Figura 5: Migração Nuclear Intercinética

Figura 6: Linhagem Glial das Células Estaminais

Figura 7: Zonas Germinativas do Cérebro Adulto

Figura 8: Formação da Zona Subventricular

Figura 9: Organização e tipos Celulares da Zona Subventricular

Figura 10: Organização e tipos Celulares da Zona Subgranular

Figura 11: Linhagem Celular das Células NG2+

Lista de Abreviaturas

APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> Proteína Precursora Amilóide
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> Factor Neurotrófico derivado do Cérebro
BLBP	<i>Brain Lipid-binding Protein</i> Proteína Ligante de Lípidos do Cérebro
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> Proteínas Morfogénicas do Osso
BO	Bulbo Olfatório
CE	Células Estaminais
CEE	Células Estaminais Embrionárias
CEG	Células Estaminais Germinais
CEN	Células Estaminais Neuronaes
CES	Células Estaminais Somáticas
CMR	Corrente Migratória Rostral
CPI	Células Progenitoras Intermediárias
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> Factor de Crescimento Epidermal
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i> Factor de Crescimento do Fibroblasto 2
FT	Factor de Transcrição
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GD	Giro Denteado
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> Proteína Acídica Fibrilar Glial
GLAST	<i>Glutamate Aspartate Transporter</i> Transportador Astrocitários de Glutamato e Aspartato
GLT1	Transportador Astrocitário de Glutamato
GMO	Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito
GR	Glia Radial
GSK3β	Glicogénio Sintase Kinase 3 beta
hAs	Astrócito Horizontal

MNI	Migração Nuclear Intercinética
NE	Neuroepitélio
NFC	Nucleotídeo Fosfohidrolase Cíclico
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> Factor de Crescimento do Nervo
Olig2	Factor de Transcrição de Oligodendrócitos 2
PCO	Precusores Celulares de Oligodendrócitos
PDGF AA	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> Factor de Crescimento Derivado das Plaquetas
PEDF	<i>Pigment Epithelium-derived Factor</i> Factor derivado do Epitélio Pigmentado
PBM	Proteína Básica da Mielina
PSEN-1	Presenilina-1
PSEN-2	Presenilina-2
rAs	Astrócito Radial
Shh	Sonic Hedgehog
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i> Factor Transformador de Crescimento beta
TN-C	Tenascina-C
TNFα	Tumor Necrosis Factor alfa Factor de Necrose Tumoral alfa
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Factor de Crescimento Endotelial Vascular
VL	Ventrículo Lateral
ZSG	Zona Subgranular
ZSV	Zona Subventricular
ZV	Zona Ventricular

1. Introdução

1.1. Organização Geral do Sistema Nervoso



mais antiga referência ao sistema nervoso (SN) remonta ao século XVIII A.C.. Sendo uma matéria amplamente estudada pelo Homem, e, apesar disso, com ainda tantas perguntas sem resposta, é compreensível que seja frequentemente considerada uma das, senão a mais, complexa e diversificada área de conhecimento (Purves et al., 2004a e Smith, 2002a).

O SN apresenta-se sob diversos formatos, tendo, na maioria das espécies, uma base morfológica comum. É vulgarmente dividido em dois sistemas: o SNC e o sistema nervoso periférico (SNP). O primeiro é composto pelo encéfalo e pela medula espinal; o segundo, pelos nervos cranianos e espinhais que transportam a informação de e para o SNC (Smith, 2002b).

Apenas em meados do século XX foi reconhecida a célula nervosa ou célula neural como a célula fundamental do SN (Purves et al., 2004a e Azevedo, 2005). A sua morfologia apesar de relativamente simples, possibilita uma numerosa distinção, estando estimada a existência de 1011 células neuronais no cérebro humano (Kandel et al., 2000).

De um modo simplificado, as células nervosas podem ser divididas em duas grandes classes: os neurónios e as células gliais ou neuroglia (Smith, 2002a). A grande diferença entre estas duas classes reside no facto de a neuroglia, ao contrário do que sucede com os neurónios, não participar directamente na transmissão sináptica, ainda que as suas funções de suporte definam e possibilitem a sua existência (Smith, 2002a e Purves et al., 2004a).

1.2. Componentes Celulares do Sistema Nervoso

1.2.1. Neurónios

Os neurónios são as células mais intensamente estudadas do corpo humano, tendo já sido descritos numerosos subtipos, todos eles partilhando uma arquitectura semelhante. Pode assim dizer-se, que a complexidade do SN não se deve tanto à especialização celular mas à associação das células em sistemas anatómicos (Kandel et al., 2000 e Smith, 2002a). A sua estrutura base é composta pela soma e respectivos dendrites e axónios. A partir do centro metabólico, corpo celular ou soma, onde se encontra o

núcleo, emergem diferentes prolongamentos, as dendrites e os axónios (Smith, 2002a e Azevedo, 2005).

As dendrites são prolongamentos relativamente curtos e geralmente adornados de pequenas saliências, as espinhas dendríticas, onde ocorrem preferencialmente os contactos pós-sinápticos com os axónios das células adjacentes (Azevedo, 2005). Devido à sua extensa arborização (o seu número pode chegar a atingir 400.000!), estas, juntamente com a soma, recebem a maioria dos impulsos provenientes dos neurónios vizinhos.

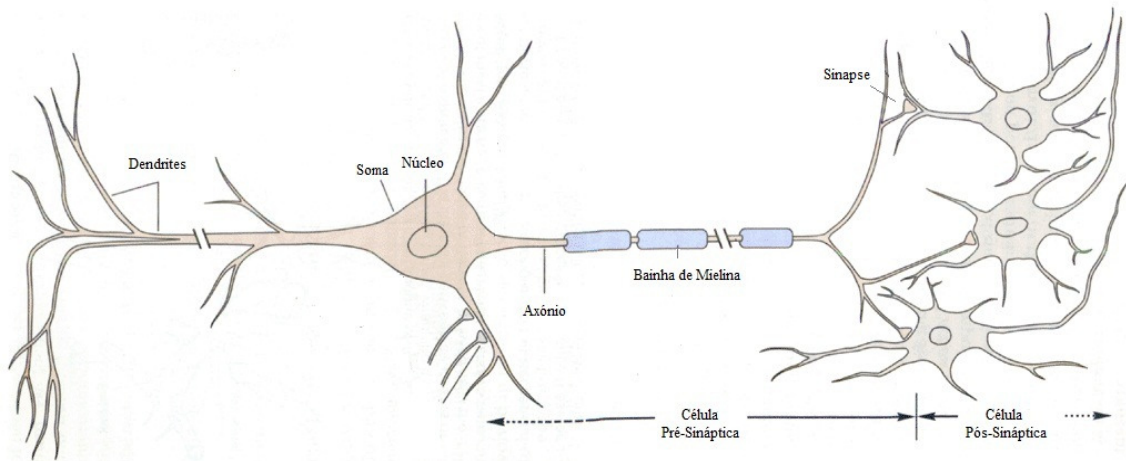


Figura 1: Estrutura do Neurónio. O núcleo encontra-se no corpo celular, designado por soma. A partir do núcleo, é possível observar dois tipos de prolongamentos, as dendrites e os axónios. Tipicamente, os axónios são envolvidos por uma bainha de mielina que permite aumentar a velocidade de condução do impulso nervoso, a qual é interrompida, a intervalos regulares, pelos nódulos de Ranvier. O potencial de acção é criado no axónio pré-sináptico, genericamente apelidado de célula pré-sináptica, e transmitido através de sinapses para a célula pós-sináptica. (Adaptado de Kandel et al., 2000)

Cada um dos impulsos recebidos é conduzido até às células-alvo através de um outro prolongamento, este sem arborizações, o axónio (Vander et al., 2006). O comprimento dos axónios é muito variável, podendo alguns apresentar poucos micrometros enquanto outros podem chegar a atingir 1 metro. A velocidade de transmissão de informação é consideravelmente superior aquando a existência de um revestimento mielínico nos axónios. O isolamento eléctrico do axónio permite que a despolarização da membrana ocorra de modo saltatório, chegando a atingir de impressionante velocidade de 100 m/s. (Azevedo, 2005).

1.2.2. Neurotransmissores

O cérebro humano contém mais de 100 mil milhões de neurónios. O mecanismo que torna possível a comunicação entre este gigantesco número de células é tão elaborado quanto eficiente e é assegurado pela existência de sinapses.

Genericamente existem dois tipos de sinapses, a sinapse eléctrica e a sinapse química. A sinapse eléctrica ocorre pela passagem de uma corrente eléctrica através de junções GAP enquanto a sinapse química, maioritária no cérebro humano, é mediada pela secreção de neurotransmissores (Purves et al., 2004a).

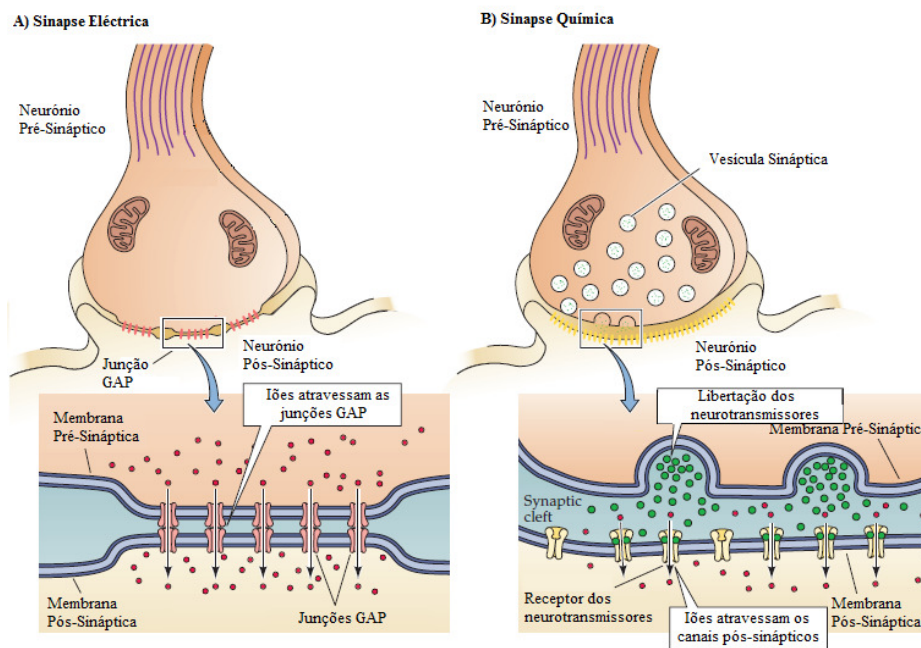


Figura 2: Mecanismos das Sinapses Eléctricas e Químicas. A) Sinapse Eléctrica: a corrente passa através das junções GAP existentes entre as membranas do neurónio pré-sináptico e do pós-sináptico. A corrente, ao alterar o potencial da membrana pré-sináptica, gera um potencial de acção na membrana pós-sináptica. B) Sinapse Química: os neurotransmissores libertados pelo neurónio pré-sináptico ligam-se aos receptores localizados na membrana pós-sináptica que pode abrir ou fechar o canal. Assim, não existindo uma continuidade intercelular como nas sinapses eléctricas, não existe passagem de corrente directa. A corrente que atravessa a membrana pós-sináptica está dependente da libertação dos neurotransmissores. (Adaptado de Purves et al., 2004a)

Devido ao extenso número de subtipos, os neurónios podem ser classificados de diversas maneiras, tendo em conta a sua função, número, modo de ramificação e orientação espacial dos prolongamentos (Azevedo, 2005).

Por outro lado, a existência das sinapses químicas permite um modo de classificação alternativo dos neurónios, com base no neurotransmissor por eles expresso.

Conforme foi já referido, a transmissão de informação ao longo dos circuitos neuronais pelas sinapses químicas é regulada por diversos sinais químicos, os neurotransmissores, que são produzidos e libertados pelos neurónios. Após a sua libertação pela célula pré-sináptica, os neurotransmissores ligam-se aos receptores dos neurónios adjacentes, designados por células pós-sinápticas.

A ligação neurotransmissor- receptor modela uma resposta, podendo esta ter um efeito inibitório ou um efeito excitatório. Dizem-se neurotransmissores inibitórios os que diminuem a probabilidade de criação de um potencial de acção na célula pós-sináptica; quando, pelo contrário, aumentam essa probabilidade, dizem-se neurotransmissores excitatórios (Purves et al., 2004a).

Conhecem-se várias dezenas de substâncias que funcionam como neurotransmissores, sendo o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glutamina, a serotonina e a dopamina os mais relevantes (Purves et al., 2004a; Suh et al., 2009). Os neurónios produtores destas substâncias dizem-se, respectivamente, GABAérgicos, glutaminérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (Suh et al., 2009).

O glutamato é o mais importante neurotransmissor conhecido com efeito excitatório, sendo que a maioria dos neurónios excitatórios no cérebro normal são glutaminérgicos e aproximadamente metade das sinapses existentes são reguladas por ele. Os neurónios inibitórios são maioritariamente representados pelos neurónios GABAérgicos e glicinérgicos (que usam a glicina como neurotransmissor) (Purves et al., 2004a).

1.2.3. Neuroglia

Os neurónios constituem apenas uma pequena parte do SN, sendo que, em determinadas zonas, o seu número chega a ser dez vezes inferior ao das células gliais (Smith, 2002a).

As células gliais, ou neuroglia, foram identificadas pela primeira vez em 1856, e devem o seu nome ao facto de se pensar que serviam, essencialmente, como material de suporte dos neurónios (glia=glue). Hoje, sabemos o quão mais extensa é a lista das suas funcionalidades, sendo uma das suas características do maior interesse para o estudo da neuroregeneração: o facto de, ao contrário dos neurónios, não perderem a capacidade de se multiplicarem após a embriogénese (Smith, 2002).

As células gliais, que se encontram frequentemente próximas dos neurónios, proporcionando-lhes um suporte tanto físico como metabólico, podem ser divididas em duas classes: a microglia e a macroglia (Kandel et al., 2000 e Smith, 2002a).

A microglia é composta por células especializadas, que apresentam o maior potencial imunitário do SNC. Essas células são mobilizadas em consequência de um ferimento, infecção ou doença e modelam uma resposta inflamatória, invadindo os tecidos lesados e influenciando a sobrevivência das células, fazendo-o em grande parte pela produção de uma variedade de citocinas (Kandel et al., 2000; Smith, 2002a e Vander et al, 2006).

Já a classe macroglial inclui três subtipos de células predominantes: os astrócitos, os oligodendrócitos e as células de Schwann (Kandel et al., 2000).

Os astrócitos, globalmente denominados astroglia, são as células gliais mais numerosas, possuindo prolongamentos de forma estrelar emergentes de um corpo celular volumoso. (Kandel et al., 2000 e Smith, 2002a). Possuem inúmeras funções como a regulação do ambiente iónico que rodeia os neurónios, a criação de potenciais de acção por ajustamento da concentração de potássio ou a remoção de neurotransmissores na proximidade das sinapses (Smith, 2002a e Vander et al, 2006). Formam uma protecção impermeável nos capilares e vénulas cerebrais, a barreira hemato-encefálica, prevenindo a passagem de substâncias tóxicas do sangue para o cérebro. Têm ainda um importante papel no transporte dos neurónios para as suas regiões alvo, e, como veremos em detalhe, um papel crucial no processo neurogénico no cérebro adulto (Vander et al., 2006).

Os oligodendrócitos encontram-se no SNC e as células de Schwann no SNP (Kandel et al., 2000). Estas células, além de cicatrizantes, e portanto capazes de remover tecido necrótico após ferimento ou morte neuronal, produzem a mielina, componente revelante na condução dos impulsos eléctricos (Kandel et al., 2000 e Smith, 2002).

(página intencionalmente em branco)

2. Origem das Células Estaminais Neurais

Os diversos tipos de células neuronais acima descritos derivam, em última instância, da camada neuroepitelial (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009). No entanto, previamente ao aparecimento do neuroepitélio, ocorre uma série de processos que permitem a formação do SN. Tudo começa por um processo designado gastrulação, durante o qual, a partir de uma única camada celular, são originadas as três camadas celulares primitivas, sendo elas, do interior para o exterior, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme.

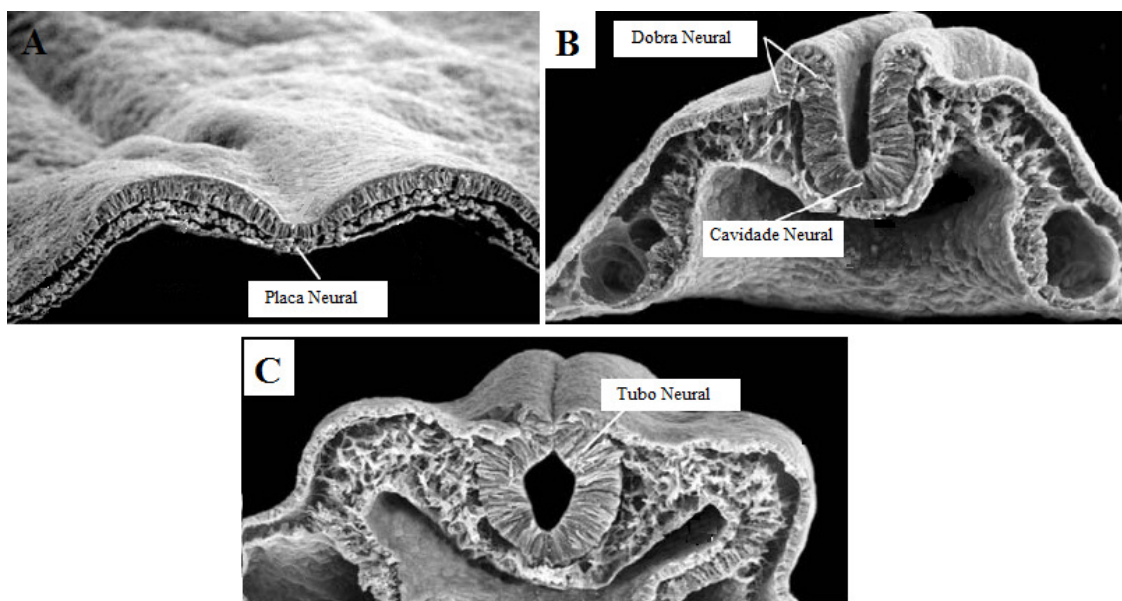


Figura 3: Alterações do Neuroepitélio durante a Neurulação. A placa neural (A) começa a sofrer dobramento, surgindo as dobras neurais (B). O posterior fecho da cavidade neural dá origem ao tubo neural (C).

(Adaptado de Rao e Jacobson, 2005)

A ectoderme é a camada responsável pela origem de todo o SN. Após a sua formação, e em resposta a diversos sinais, dá origem à placa neural, num processo conhecido por neurulação (Rao e Jacobson, 2005). A partir da placa neural, surge a primeira estrutura neuronal no desenvolvimento embrionário do ser humano, o tubo neural, composto por uma única camada pseudoestratificada, o neuroepitélio (Kee et al., 2008). As células que constituem o tubo neural, denominadas células neuroepiteliais (NE), são as que apresentam o maior potencial diferenciador do corpo humano (Purves et al., 2004b).

Durante o desenvolvimento embrionário, o neuroepitélio sofre um progressivo engrossamento, aumentando o número de camadas. A camada mais próxima dos

ventrículos laterais (VL), os principais locais germinativos do cérebro, é conhecida por zona ventricular (ZV) (Götz e Huttner, 2005).

2.1. Glia Radial como fonte de Células Estaminais

As primeiras células a distinguir-se das células NE são as células gliais radiais (Doetsch, 2003). A glia radial (GR) sempre foi considerada um produto intermediário da diferenciação neuronal, essencial pelo papel de suporte à migração de neurónios no cérebro em desenvolvimento (Doetsch, 2003 e Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

A visão clássica da evolução das linhagens neuronal e glial integrava duas etapas evolutivas distintas, de acordo com o modelo proposto, há mais de um século, por Wilhelm His, em que este autor sugeria a existência de diferentes progenitores para os neurónios e para as células gliais (Malatesta e Götz, 2013). No entanto, estudos recentes permitem admitir que não só as linhagens glial e neuronal não se encontram separadas, como integram percursos muito semelhantes (Doetsch, 2003).

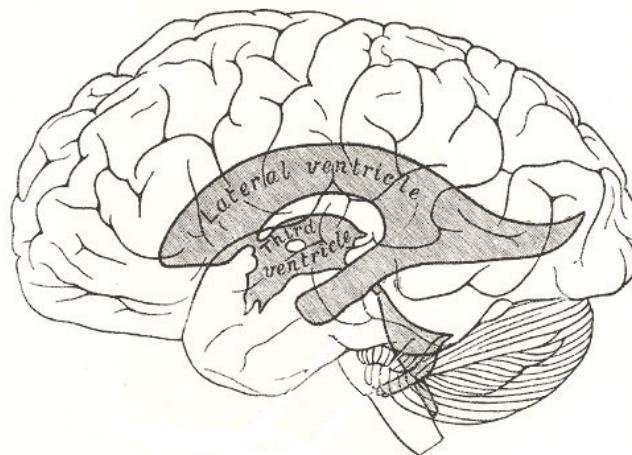


Figura 4: Localização dos Ventrículos Laterais. O sistema ventricular é composto pelos ventrículos laterais esquerdo e direito, pelo terceiro ventrículo e pelo quarto ventrículo. (Adaptado de Gray H., 1918)

2.1.1. De Células NE a Células GR

O processo envolvido na transformação das células NE nas diferentes linhagens neurogênicas tem sido alvo de intensos estudos.

Após o início da neurogênese, as células NE começam a revelar certas características das células gliais, originando, mais tarde, a glia radial (Götz e Huttner, 2005 e Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

Os primeiros indícios de que as células da GR se comportam como células estaminais no cérebro em desenvolvimento surgiram a partir dos estudos clonais em que se demonstrou, utilizando técnicas retrovirais, que uma única célula da GR pode dar origem a uma outra célula radial ou a um neurónio (Doetsch, 2003).

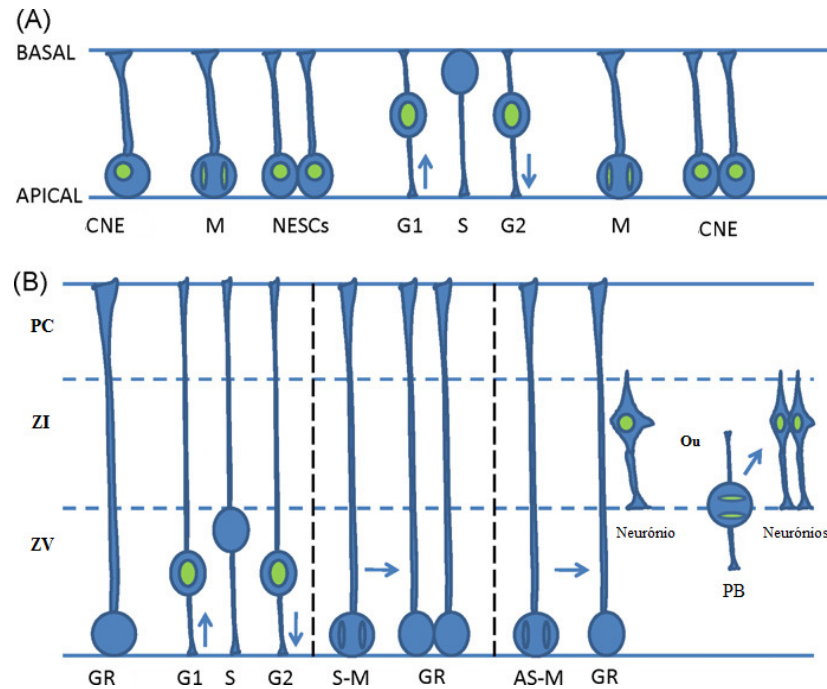


Figura 5: Migração Nuclear Intercinética nas células neuroepiteliais (A) e na glia radial (B). As CE sofrem MNI desde a superfície apical até à basal de modo a gerar, por divisões simétricas, novas CE. Os progenitores celulares GR apenas sofrem MNI na zona ventricular (ZV). Neste caso, a divisão pode ser simétrica (S-M), sendo originadas duas novas células GR ou assimétrica (AS-M), originando uma célula GR ou um progenitor basal (PB). Estes progenitores dão origem, na zona intermediária (ZI) onde se dividem simetricamente, a dois neurónios que posteriormente se deslocam para a placa cortical (PC). (Adaptado de Wynshaw-Boris et al., 2010)

Mais tarde, observou-se que algumas características moleculares são partilhadas pelas células NE e pela GR; é o caso da presença do filamento intermédio nestina e de antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais RC1 e RC2. (Alvarez-Buylla et al., 2002; Kriegstein e Götz, 2003 e Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

Uma outra característica comum a estes dois tipos celulares é o facto de ambos apresentarem migração nuclear intercinética (MNI), sendo esta a razão pela qual o neuroepitélio apresenta uma estrutura pseudoestratificada.

Ao longo das diferentes fases do ciclo celular, o núcleo de uma célula neuroepitelial apresenta migração intercinética. A fase M, e portanto a divisão nuclear, ocorre junto à superfície apical enquanto que a fase S, de replicação do DNA, ocorre junto à superfície

basal. Por conseguinte, os núcleos que se encontram na fase G1 migram da zona basal para a apical e os núcleos que se encontram na fase G2 migram da zona apical para a basal. Durante todo o processo de MNI tanto as células NE como a GR apresentam uma estrutura bipolar, mantendo-se em contacto com a superfície apical junto ao ventrículo e com a superfície basal junto da membrana pia-máter (Pinto e Gotz, 2008 e Wynshaw-Boris et al., 2010)

A GR, sendo um progenitor com potencial diferenciador mais restrito, apenas sofre migração nuclear na zona ventricular e não em toda a extensão entre as superfícies apical e basal, ao contrário das células NE (Wynshaw-Boris et al., 2010).

Apesar do extenso estudo sobre este complexo mecanismo, muito está ainda por revelar e apenas recentemente se passou a admitir que a MNI pode estar envolvida na neurogénese, visto que, em resposta ao bloqueio deste mecanismo, ocorrem alterações na progressão do ciclo celular. Pensa-se que a exposição do núcleo a factores neurogénicos ou proliferativos está envolvida (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

2.1.2. De GR a Astrócitos

Enquanto certas características das células NE passam a ser observáveis nas células gliais radiais, também características gliais, especialmente dos astrócitos, se tornam presentes na GR sendo que algumas delas podem ser traçadas ao longo de toda a linhagem celular, desde as células NE até aos astrócitos especializados.

A descoberta de processos neurogénicos no cérebro adulto, associada à constatação de que a GR se comporta como progenitora celular no cérebro em desenvolvimento, levou às tentativas de identificação de células estaminais adultas e de diferenciação destas relativamente às células estaminais embrionárias (CEE). As semelhanças adiante referidas e o facto de o desaparecimento da GR coincidir com o aumento do número de astrócitos levou à formulação da hipótese de que as células estaminais adultas derivam da GR (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

Durante o desenvolvimento embrionário, dois tipos de transportadores, os GLAST (transportador astrocitário de glutamato e aspartato) e os GLT1 (transportador astrocitário de glutamato) que permitem a conversão de glutamato em glutamina por parte dos astrócitos, tornam-se presentes na GR.

A presença de grânulos de glicogénio, uma das marcas dos astrócitos adultos, a expressão de certos marcadores de astrócitos como a proteína ligante de lípidos do cérebro (BLBP), a tenascina C (TN-C) e, em algumas casos, a proteína ácida fibrilar

glial (GFAP) e a proteína $\text{s100}\beta$, são alguns exemplos de características astrocitárias que surgem na GR (Kriegstein e Götz, 2003 e Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

A GR pode ser encontrada, ainda que transitoriamente, em quase todas as regiões do cérebro, durante a neurogênese (Kriegstein e Götz, 2003). No final do processo neurogênico embrionário, a GR retrai os seus prolongamentos e diferencia-se em astrócito (Alvarez-Buylla et al., 2002 e Kriegstein e Götz, 2003). Assim, no cérebro adulto do mamífero persistem poucas ou mesmo nenhuma células gliais radiais, levantando a questão da identidade dos precursores primários para os novos neurónios.

2.2. Desenvolvimento Cerebral Pós-Natal

Diversos estudos indicam que a GR se comporta como célula estaminal no cérebro em desenvolvimento. Existem também evidências crescentes que apontam para uma subpopulação de astrócitos como células estaminais no período pós-natal (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

2.2.1. O que são as Células Estaminais?

As CEE são populações de células pluripotentes com a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em todos os tipos celulares maduros do corpo. Derivam dos blastócitos e originam, durante o desenvolvimento embrionário, três camadas diferentes: a ectoderme, a endoderme e a mesoderme. Posteriormente, o embrião forma dois tipos de células estaminais, as células estaminais somáticas (CES) que participam na organogênese e as células estaminais germinais (CEG) que dão origem às gâmetas (Li e Xie, 2005).

Pensava-se que o tecido nervoso era uma exceção a este processo, até ter sido possível observar células estaminais neurais. As CEN têm um potencial mais restrito do que as CEE na medida em que, ao contrário destas, apenas originam células pertencentes ao tecido nervoso, não sendo pluripotentes mas sim multipotentes (Purves et al., 2004b). Estas células encontram-se em microambientes particulares, os nichos, mais à frente descritos, que diferem na sua estrutura e organização consoante o tipo de tecido (Li e Xie, 2005).

2.2.2. Evolução das Células Estaminais

No início do desenvolvimento embrionário, as células NE sofrem divisões simétricas originando novas células NE (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009). Estas diferem da GR quanto à sua divisão, dado que a GR sofre tanto divisão simétrica como assimétrica (Wynshaw-Boris et al., 2010).

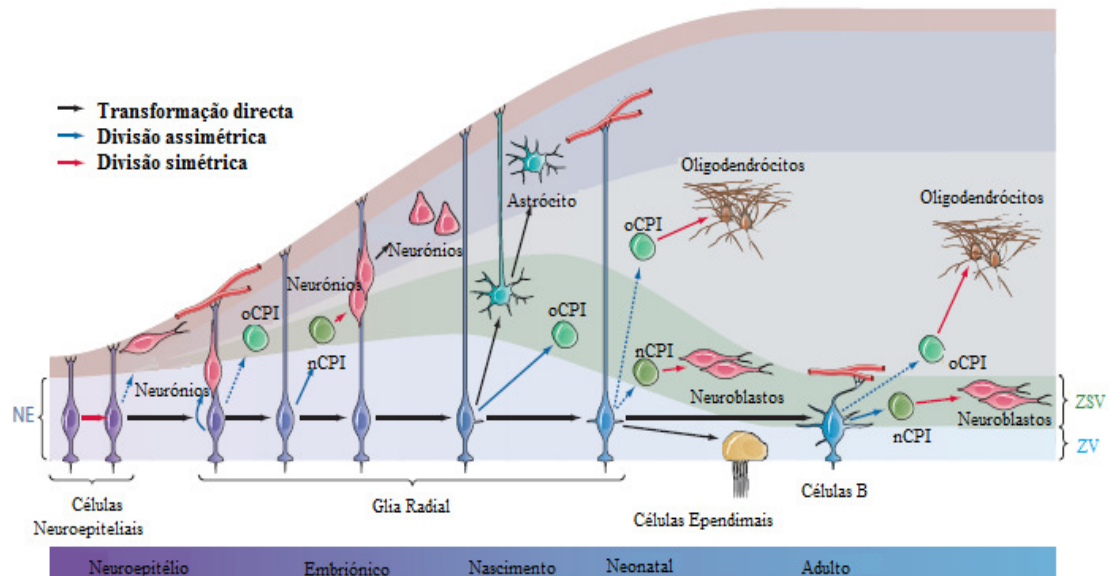


Figura 6: Linhagem Glial das Células Estaminais. As células neuroepiteliais, na fase inicial do desenvolvimento embrionário, sofrem divisão simétrica originando mais células neuroepiteliais, enquanto outras parecem gerar também neurónios. Com o desenvolvimento cerebral, as células neuroepiteliais dão origem às células gliais radiais (GR). A GR pode gerar neurónios directamente ou, através de células progenitoras intermediárias (CPI), originar oligodendrócitos (oCPI) ou neurónios (nCPI). No final do desenvolvimento embrionário, as células GR perdem a sua polaridade apical-basal e transformam-se em astrócitos (a produção destes astrócitos pode ocorrer também através de CPI, não estando estes ilustrados na figura). Parte da glia neonatal mantém, no entanto, esta polaridade comportando-se como células estaminais no neonato, outra parte diferencia-se em células endoteliais e em células B (os astrócitos da ZSV). Estas células B são as células estaminais do cérebro adulto, continuando a gerar neurónios e oligodendrócitos através dos CPI.

ZV, Zona Ventricular. ZSV: Zona Subventricular. NE: Neuroepitélio.

(Adaptado de Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009)

Após a transformação das células NE em GR, a divisão passa a assimétrica. A produção de células maduras nem sempre ocorre directamente, por vezes, a GR dá origem a um precursor intermediário, com um potencial mais restrito, as células progenitoras intermediárias (CPI). As CPI são caracterizadas em função do produto final a que dão origem, e designadas por nCPI, caso originem neurónios, ou por oCPI ou aCPI, caso produzam, respectivamente, oligodendrócitos ou astrócitos.

Algumas células da GR diferenciam-se em células endoteliais, enquanto outras, já no cérebro adulto, dão origem às células B, um subtipo de astrócitos. Sendo as células B estaminais, como veremos em detalhe mais à frente, também estas irão dar origem a oligodendrócitos e aos neuroblastos (células precursoras neurais).

Ao contrário da GR, que se divide predominantemente por divisão assimétrica, os nCPI sofrem divisões simétricas originando, por exemplo, dois neurónios ou dois nCPI adicionais. O número de vezes que os CPI se dividem depende tanto da espécie animal como da região cerebral (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

Assim, as células GR e as células B parecem dar origem a quase todos, se não todos, os tipos neurais existentes no SNC.

(página intencionalmente em branco)

3. Zonas Germinativas do Cérebro Adulto

Apesar dos trabalhos anteriormente realizados por Altman e Kaplan, apenas no início dos anos 80, com a ajuda de tecnologia de ponta, se tornou irrefutável a ideia de que a neuroregeneração ocorre no cérebro adulto.

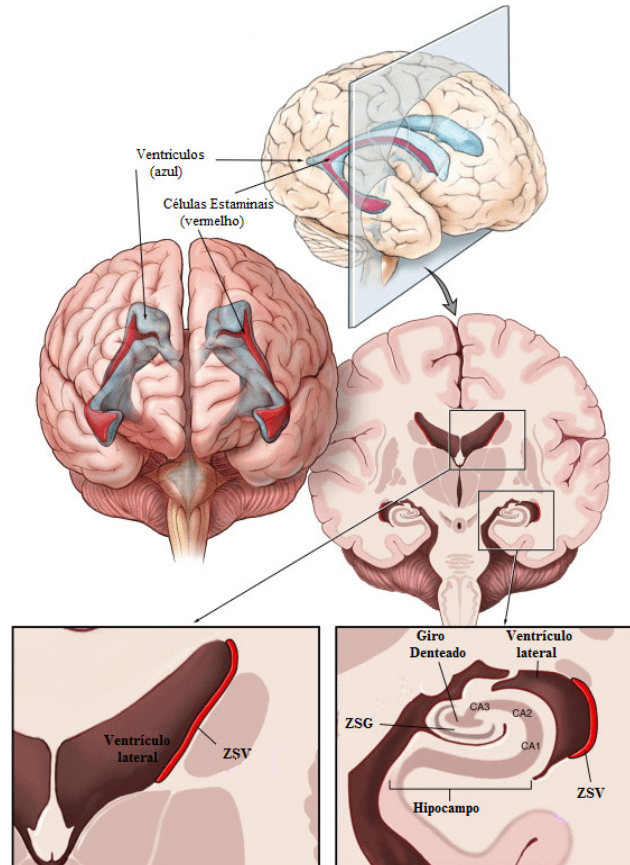


Figura 7: Zonas Germinativas do Cérebro Adulto. A zona subventricular (ZSV), a maior região neurogênica, está localizada ao longo do ventrículo lateral, ao passo que a zona subgranular (ZSG) está localizada no giro dentado do hipocampo, o qual é composto pelas regiões CA1, CA2 e CA3. (Adaptado de Barani et al., 2007)

Um dos mais notáveis trabalhos neste domínio foi o realizado por Nottebohm e seus colegas. Demonstraram que, nos pássaros adultos, o nascimento de novos neurônios ocorre no mesmo local que na embriogênese, isto é, na camada subependimal adjacente ao VL. Outros estudos subsequentes demonstraram o mesmo fenômeno em roedores, macacos e humanos (Mendez-Otero et al., 2005).

Outro estudo de extrema importância na definição da identidade das células estaminais neurais foi realizado em 1992 por Reynolds, Weiss e seus colegas. Isolaram células provenientes do SNC do cérebro em desenvolvimento e do cérebro adulto de um rato e

mostraram que estas, na presença do factor de crescimento epidermal (EGF), dão origem a um agregado esférico de células, ao qual deram o nome de neuroesfera. Estas neuroesferas são compostas por neurónios e neuroglia e expressam o filamento intermediário nestina, previamente associado às células estaminais. Foi demonstrado, ainda, que uma neuroesfera é originada a partir de uma única célula, podendo, ao ser dissociada, dar origem a uma nova neuroesfera, também esta contendo neurónios e células gliais. As células das neuroesferas apresentam assim características de células estaminais, isto é, capacidades de auto-renovação e multipotência (Reynolds e Weiss, 1992). A capacidade de formação de neuroesferas é utilizada, hoje em dia, como um meio de ensaio para comprovar a existência de populações com características das células estaminais num determinado tipo de células ou tecidos neurais.

Hoje é inequivocamente aceite pela comunidade científica que a neurogénese continua activa, embora estando confinada a duas regiões do SNC do cérebro adulto: a ZSV do VL e a ZSG do GD do hipocampo (Alvarez-Buylla et al., 2002). Nestes locais, as células estaminais proliferam e sofrem, posteriormente, migração e diferenciação (Gage H., 2002).

3.1. A Zona Subventricular

3.1.1. Formação da Zona Subventricular

O cérebro do mamífero é inicialmente composto por uma camada de células ao longo do ventrículo, designada por zona ventricular. A proliferação das células estaminais que aqui se encontram determina a formação de uma segunda zona, por baixo desta, designada por ZSV.

Ao longo do desenvolvimento pós-natal há uma redução do tamanho destas zonas, sendo que no cérebro adulto apenas uma pequena parte, a ZSV, continua proliferativamente activa. Esta é a maior região neurogénica do cérebro adulto (Conover e Allen, 2002).

A ZSV é composta por células localizadas ao longo de quase toda a parede lateral do VL, separada desta apenas por uma camada de células endimais. Em certos locais, as células em divisão estendem os seus prolongamentos até ao VL (Doetsch, 2003).

Em murganhos, as células da ZSV são capazes de se diferenciar em novos neurónios que, após migração para o bulbo olfatório (BO), substituem constantemente os interneurónios. Foi sugerido que certos neurónios migram para diferentes locais

cerebrais, mantendo-se este facto, no entanto, por demonstrar (Alvarez-Buylla et al., 2002 e Doetsch, 2003).

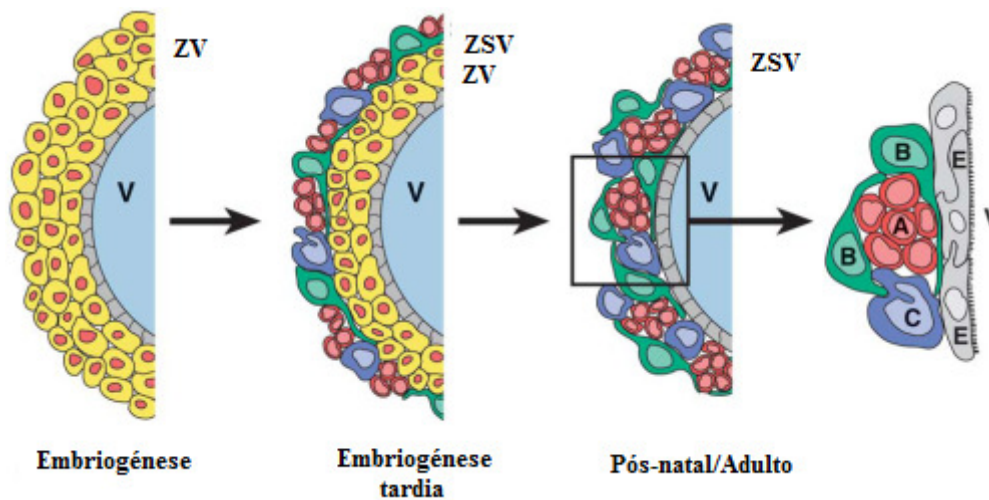


Figura 8: Formação da Zona Subventricular. No cérebro embrionário é possível observar diversas camadas de células estaminais junto ao ventrículo (V), formando a chamada zona ventricular (ZV). Durante o desenvolvimento, é possível observar a formação de uma nova camada germinal, a zona subventricular (ZSV), sendo esta a camada que persiste no cérebro adulto. Esta zona é composta por neuroblastos (células A), por astrócitos (células B) e por amplificadores transitórios (células C). Todas estas células se encontram separadas do ventrículo por uma camada de células endoteliais (E). (Adaptado de Conover e Allen, 2002)

3.1.2. Células Estaminais na Zona Subventricular

O passo seguinte após confirmação da produção de novos neurónios na ZSV, foi a identificação das células estaminais. A investigação revelou-se árdua, em grande parte devido ao facto de muitas dessas células se apresentarem num estado quiescente e, também, à falta de marcadores para a identificação das CEN.

Duas visões distintas foram propostas. Uma investigação, conduzida por Jonas Frisé, apontou as células endoteliais como responsáveis pela formação de novos neurónios. Pelo contrário, o laboratório de Alvarez-Buylla apontou as células gliais, especificamente os astrócitos, como sendo os precursores primários.

De modo a corroborar a sua teoria, a equipa de Jonas Frisé isolou e marcou células endoteliais da ZSV, demonstrando que estas dão origem a neuroesferas multipotentes capazes de se auto-renovar.

Foi Laywell e a sua equipa que, mais tarde, ao examinar tanto o potencial das células endoteliais como dos astrócitos da ZSV, provou que as primeiras são unipotentes com capacidade de originar apenas células gliais. Mostrou ainda que os astrócitos da ZSV

conseguem formar neuroesferas com posterior diferenciação em células gliais e em neurónios.

Talvez por não ter utilizado técnicas adequadas, a equipa de Jónas Frisen pode ter identificado erroneamente uma subpopulação de astrócitos, que tocava pontualmente no ventrículo, como células endoteliais (Conover e Allen, 2002).

3.1.3. Astrócitos da Zona Subventricular como Células Estaminais

De modo a confirmar a potencialidade proliferativa dos astrócitos da ZSV foram realizados diversos estudos *in vivo* dos quais dois se destacaram.

Após a infusão de um agente antimitótico, o Ara-C, no cérebro de um ratinho adulto durante 6 dias, verificou-se uma depleção das células proliferativas (neuroblastos e células C) com a sobrevivência de algumas células endoteliais e astrócitos. Apenas 12 horas após o término da infusão, os astrócitos começaram a dividir-se, dando origem a células tipo C que, por sua vez, originaram os neuroblastos. A regeneração ficou completa em apenas 10 dias.

Noutra linha de investigação utilizaram-se astrócitos em divisão infectados com um retrovírus aviário. Utilizou-se um rato transgénico com um gene capaz de expressar o receptor para o vírus da leucose aviária, na presença do promotor GFAP-TVA. Como os mamíferos, normalmente, não possuem este receptor, o que os impossibilita de contrair o vírus, este método é um meio directo de rastreabilidade da linhagem dos astrócitos em divisão. Observou-se a migração de diversos neurónios rotulados para o BO, onde estes se diferenciaram em células granulares ou periglomerulares (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Estes resultados sugerem que os astrócitos da ZSV, as células B, correspondem às células estaminais no adulto.

3.1.4. Organização da Zona Subventricular

Na composição da ZSV, está actualmente determinada a presença de três fenótipos, designados por células A, células B e células C (Mendez-Otero et al., 2005).

Na ZSV existem células quiescentes, as células B, também designadas por astrócitos da ZSV. Estas células possuem características semelhantes às dos astrócitos, como a expressão de GFAP e GLAST, citoplasma leve, junções GAP e a presença de grânulos de glicogénio. As células B dão origem às células C proliferativas, que funcionam como CPI no cérebro adulto (Doetsch, 2003).

Por sua vez, as células C diferenciam-se em células A, os neuroblastos imaturos. Os neuroblastos proliferam e migram ao longo do VL até ao BO através da corrente migratória rostral (CMR), onde se diferenciam em interneurónios (Alvarez-Buylla et al., 2002 e Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

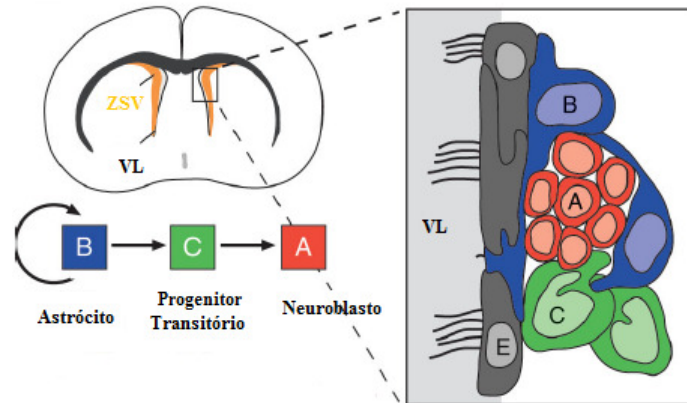


Figura 9: Organização e tipos Celulares da Zona Subventricular. Vista frontal do cérebro de um rato adulto, mostrando a zona subventricular (ZSV), adjacente aos ventrículos laterais (VL). Os astrócitos da ZSV são células estaminais que dão origem aos neuroblastos (células A) através das células C (progenitores transitórios). As células endimais (E) formam uma camada ao longo do ventrículo lateral, sendo que pontualmente, entre as células endimais, o astrócito da ZSV toca na superfície do ventrículo lateral.

(Adaptado de Doetsch, 2003)

Esta corrente é uma cadeia homotípica formada por células A que aderem à parede da ZSV. As cadeias estão revestidas por células B, que proliferam lentamente. Ao longo das cadeias de células A podem ser encontrados os aglomerados de células C dispersos, as quais proliferam rapidamente (Alvarez-Buylla et al., 2002).

3.1.5. Migração das Células para o Bulbo Olfatório

Mais de 30.000 neuroblastos migram diariamente da ZSV para a CMR do cérebro do rato. Depois de se destacarem das paredes da estrutura tubular, os neuroblastos agrupados em cadeias migram tangencialmente através da CMR para o BO, percorrendo distâncias entre os 5 e os 8 mm, fazendo da CMR o percurso mais longo percorrido pelas células no cérebro em desenvolvimento e no cérebro adulto (Lledo et al., 2006 e James et al., 2011). Quando chegam ao BO, em resposta a um conjunto de sinais, as células destacam-se das cadeias e migram para a sua região alvo (Ming e Song, 2005). Estas migram, agora radialmente, para as camadas granulares e periglomerulares, diferenciando-se em dois tipos celulares maduros, as células granulares e as células

periglomerulares (Conover e Allen, 2002 e Lledo et al., 2006). Estas células integram depois os circuitos neuronais já existentes (James et al., 2011).

3.2. A Zona Subgranular

3.2.1. Células Estaminais da Zona Subgranular

Outra região onde ocorre a produção de novos neurónios no cérebro adulto é a ZSG que está localizada na interface da camada celular granular do GD e do hilus do hipocampo (Alvarez-Buylla et al., 2002). Na ZSG são gerados neurónios granulares, que percorrem uma curta distância até à camada celular granular (Doetsch, 2003).

A localização e identidade precisa das células estaminais na ZSG é menos clara do que na ZSV. Sendo os astrócitos da ZSV capazes de originar novos neurónios, estudou-se a possibilidade de o mesmo ocorrer com os astrócitos da ZSG.

Os primeiros trabalhos identificaram algumas células indiferenciadas marcadas de cor escura como correspondentes a células estaminais. Em paralelo, outros trabalhos, mostraram que os astrócitos se continuavam a dividir na ZSG.

Após a injeção de BrdU ou [3H]-Timidina (nucleósidos utilizados comumente para a detecção de células proliferativas *in vivo*), constatou-se que 60% a 80% das células marcadas correspondiam a astrócitos. No entanto, pouco tempo depois, o seu número diminuiu com o concomitante aumento de células GFAP-negativas com características semelhantes às células marcadas de cor escura – as células D (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Um tratamento com um agente anti-mitótico, semelhante ao realizado na ZSV, eliminou as células D e alguns astrócitos. Mesmo após a eliminação de células em divisão, os astrócitos da ZSG dividem-se originando neurónios granulares, com as células D como intermediárias. Outro teste utilizando ratos GFAP-TAV, semelhante ao realizado na ZSV, demonstrou que os astrócitos, em condições normais, originam neurónios granulares (Doetsch, 2003).

3.2.2. Os Astrócitos e as Células D

A ZSG possui, assim, dois tipos celulares em divisão, os astrócitos e as células D, com um pequeno núcleo e marcadas de cor escura.

Na ZSG pelo menos dois tipos de astrócitos GFAP+ foram caracterizados, os horizontais (hAs) e os radiais (rAS). Os hAs estendem grandes prolongamentos através

da barreira da ZSG e não expressam nestina, um marcador de progenitores imaturos, e correspondem à astroglia tradicional. Os rAs têm prolongamentos radiais que se estendem até à camada celular granular intercalados com prolongamentos finos. Alguns rAs encontram-se perto de vasos sanguíneos e expressam nestina (Ma et al., 2005).

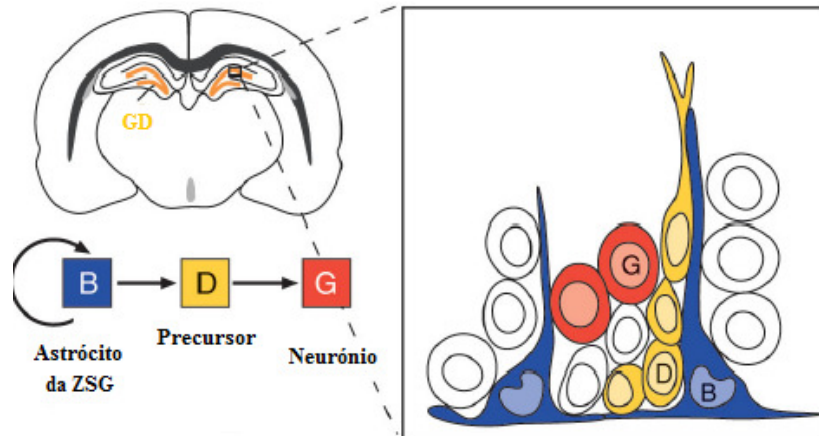


Figura 10: Organização e tipos Celulares da Zona Subgranular. Vista frontal do cérebro de um ratinho adulto, mostrando a zona subgranular (ZSG). Os astrócitos da ZSG (B) são células estaminais que dão origem a um precursor intermediário (D) que, por sua vez, originam neurónios granulares (G). (Adaptado de Doetsch, 2003)

Os rAs da ZSG, também referidos como progenitores tipo I, funcionam como precursores primários dos novos neurónios no GD. Estes astrócitos geram as células D, também designadas por progenitores tipo II.

Os novos neurónios originados na ZSG do cérebro adulto têm sido associados aos processos de aprendizagem e de memorização, ao passo que o excesso ou a deficiência nos processos neurogénicos desta região têm mostrado estar relacionados com patologias neurológicas (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

3.3. Regiões não Neurogénicas

As células estaminais e progenitores neurais multipotentes foram já isoladas a partir de diversas regiões, que não são nichos neurogénicos, do SNC do mamífero (Taupin, 2008a).

Apesar do número de neurónios gerados nestas zonas, designadas por não neurogénicas, ser reduzido, foram realizadas diversas experiências usando células estaminais daí isoladas. Surpreendentemente, *in vitro*, estas células formam tanto

células gliais como neurónios. Tal não acontece *in vivo*, em que as CEN das regiões não neurogênicas se diferenciam, marioritariamente, em neuroglia (Jordan et al., 2007).

Assim, as células destas regiões contribuem, em condições normais, para a gliogênese, enquanto, sob condições patológicas, parecem ser capazes de também produzir neurónios, sugerindo que o potencial neurogênico se encontra presente em todo o SNC (Sailor et al., 2006).

4. A Glia NG2+ como Células Estaminais

4.1. Novo Grupo Neural

O início dos anos 80 revelou a existência de uma nova subpopulação glial. O principal estudo responsável por esta descoberta utilizou o antisoro de um coelho contra células tumorais do cérebro de um rato e identificou um novo epítipo, o qual não exibia características correspondentes às das células gliais ou das células neuronais. Foi designado por NG2 (Nishiyama et al., 2009).

O NG2 é um proteoglicano de sulfato de condroitina, também conhecido por CSPG4, predominantemente expresso no cérebro, constituindo 5% a 10% da população glial total, e podendo ser encontrado tanto na matéria branca como na cinzenta (Nishiyama et al., 2009 e Zhang et al., 2013).

A presença ubíqua destas células levou a que fossem consideradas como uma “quinta célula nervosa”, passando a considerar-se que a glia é composta por astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, microglia e células NG2 (Richardson et al., 2011)

Após o seu ciclo celular, que tem a duração aproximada de 1 mês, as células diferenciam-se maioritariamente em oligodendrócitos ou em novas células gliais NG2. Estudos *in vitro* revelaram uma particularidade surpreendente: a sua aparente capacidade de originarem não só oligodendrócitos mas também astrócitos e neurónios (Robel et al., 2011).

4.2. Precusores Celulares de Oligodendrócitos

As células NG2+ começaram por ser classificadas como progenitores O2A devido à sua capacidade de originar astrócitos tipo II em culturas de células nervosas ópticas do rato perinatal. Hoje, são denominadas precursoras celulares de oligodendrócitos (PCO) (Richardson et al., 2011).

Estas células expressam os marcadores típicos dos PCO como o O4 e o PDGFR α e dão origem a quase todos, se não todos, os oligodendrócitos do SN (Mangin e Gallo, 2011). Estudos recentes sugerem também a expressão do factor de transcrição Nkx2.2 e do Olig1, ambos característicos dos PCO (Polito e Reynolds, 2005). As NG2+ dependem do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF AA) para a sua sobrevivência e proliferação, sendo que quase todas expressam o seu receptor, o PDGFR α . As células

com a expressão deste receptor demonstraram ser a maior fonte de oligodendrócitos, resultando da perda do PDGF AA a perda de células PDGFR α + e, consequentemente, a perda de oligodendrócitos (Nishiyama et al., 2009).

Os PCO correspondem geralmente aos oCPI, no entanto, ao contrário dos segundos que apenas proliferam activamente na ZSV, os PCO NG2+ proliferam também fora dos nichos neurogénicos (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

4.3. Características especiais das Células NG2+

Algumas das características apresentadas por estas células são bastante distintas das que, tipicamente, se encontram nos PCO (Mangin e Gallo, 2011).

Uma delas é o facto de estarem presentes uniformemente na matéria branca e na cinzenta, sendo a sua distribuição, curiosamente, relativamente independente da distribuição de fibras mielinizadas. Exibem, no entanto, uma tendência para se associarem às somas e dendrites dos neurónios (Polito e Reynolds, 2005 e Mangin e Gallo, 2011).

As células apresentam uma estrutura estrelar e em todos os estágios apresentam múltiplos prolongamentos finos, com número e comprimento variáveis consoante a sua idade e a sua localização (Nishiyama et al., 2009).

O facto de continuarem a proliferar no cérebro adulto e de possuírem a capacidade de manterem latentes (apenas em caso de patologia ou dano são capazes de originar astrócitos e neurónios) e de receberem sinapses dos neurónios tornam estas células únicas e de extremo interesse para futuras aplicações terapêuticas (Mangin e Gallo, 2011). Sabe-se que expressam alguns canais iónicos e receptores de neurotransmissores, tendo sido já demonstrada a comunicação sináptica, glutamatérgica e GABAérgica, com os neurónios, tanto na matéria branca como na cinzenta (Mangin e Gallo, 2011 e Richardson et al., 2011).

4.4. Diferenciação das Células NG2 em Oligodendrócitos

Os primeiros precursores neurais foram identificados no cérebro do ratinho devido à expressão do receptor PDGFR α e da DM20 (isoforma da proteína proteolípídica mais abundante na mielina). Com origem nas zonas ventriculares, os precursores migram para diversos locais onde passam a ser imunopositivos para o NG2. No início da fase pós-natal as células NG2+PDGFR α + já se encontram distribuídas uniformemente ao

longo do SNC, apresentando uma morfologia homogênea e um fenótipo sugestivo de funções homólogas entre elas.

Com a gradual diferenciação das células NG2+PDGR α + em oligodendrócitos, há uma perda de expressão destes antígenos e as células entram numa fase intermediária com imunoreactividade ao O4, o pro-oligodendrócito.

Após diferenciação completa, as células passam a apresentar os marcadores típicos de oligodendrócitos maduros como o nucleotídeo fosfohidrolase cíclico (NFC), a proteína básica de mielina (PBM) e glicoproteína da mielina do oligodendrócito (GMO).

Apesar de ser comumente aceite que as células NG2 são PCO e consequentemente originam oligodendrócitos, a demonstração *in vivo* dessa ideia não tem sido fácil porque a expressão de NG2 é perdida antes da diferenciação terminal que leva ao aparecimento de oligodendrócitos maduros. Em todo o caso, um estudo que utilizou uma marcação com BrdU observou, ao longo do tempo, uma diminuição do número de células BrdU+NG2+ com um concomitante aumento de oligodendrócitos BrdU+. Por outro lado, em diversas outras experiências ficou também demonstrado que, quando transplantadas para ambientes desprovidos de células mielinizantes, as células NG2 são capazes de as originar (Nishiyama et al., 2009).

4.5. Células NG2+ em resposta à Dismielinização

Utilizando modelos animais sob condições desmielinizantes é possível observar o quão rápido e eficiente é o processo de remielinização dos axónios. No entanto, os oligodendrócitos resistentes a lesões não são os responsáveis por tal processo.

Acredita-se que outros factores PCO endógenos são a fonte das novas células mielinizantes. Em resposta a lesões, as NG2 sofrem diversas alterações incluindo o aumento do tamanho dos seus somas, a diminuição e engrossamento dos seus prolongamentos e o aumento da sua imunoreactividade. Em comparação com outras células gliais, as células NG2 são as primeiras a actuar e com maior taxa de proliferação. Tais fenómenos ocorrem apenas em resposta a lesões que causam dismielinização ou destruição generalizada de um órgão (Polito e Reynolds, 2005).

4.6. As Células NG2 originam Astrócitos e Neurónios?

Apesar da consistência dos resultados quanto ao destino oligodendrocítico, os relativos à diferenciação astrogliar e neuronal têm sido divergentes (Nishiyama et al., 2009).

A maioria dos resultados foram obtidos utilizando a tecnologia Cre-loxP. Este método utiliza linhagens de ratinhos transgênicos que expressam a Cre-recombinase sob diversos promotores activos nas células NG2. Quando as linhagens são cruzadas, a expressão do gene reporter Cre fica permanentemente activa nas células que expressam Cre, permitindo a identificação da sua proveniência pela expressão persistente deste reporter (Nishiyama et al., 2009).

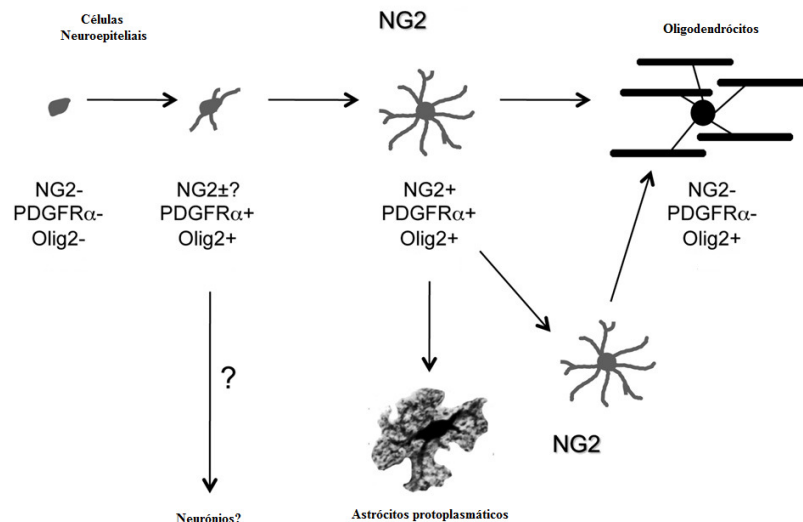


Figura 11: Linhagem Celular das Células NG2+. As células NG2 têm origem em células NG2-/PDGFRα, que, durante o seu processo de migração, passam a expressar NG2. Estas células são capazes de originar oligodendrócitos e parecem poder originar também uma subpopulação de astrócitos protoplasmáticos, no cérebro imaturo. Quanto ao seu destino neuronal, os resultados são controversos, sendo ainda necessário aprofundar a investigação. (Adaptado de Trotter et al., 2010)

Um dos estudos quantificou os oligodendrócitos com expressão do reporter Cre, obtendo valores semelhantes aos da eficiência da Cre-recombinase e indicando que todos os oligodendrócitos são derivados de células que expressam NG2 num determinado momento na sua vida. Uma população de astrócitos na matéria cinzenta aparentou ser também derivada de células NG2. No entanto, nenhum dos astrócitos GFAP+ da matéria branca deriva destas células, em condições normais, demonstrando uma heterogeneidade na fonte de astrócitos.

O facto de não se encontrarem células com a concomitante expressão de NG2 e GFAP, levou a que se pensasse que a geração de astrócitos tipo II seria um artefacto criado *in vitro*. No entanto, quando se transplantaram células NG2 para um ambiente desprovido de células gliais, ao fim de algum tempo observaram-se tanto oligodendrócitos como

astrócitos. Este resultado sugere que as NG2 têm a capacidade de se diferenciar em astrócitos, apesar de, em condições normais, não serem capazes de cumprir este destino *in vivo* (Nishiyama et al., 2009).

Outro ensaio demonstrou o seu potencial de diferenciação neuronal. Oito dias após a indução de Cre, a maioria das células reporter + na matéria branca são oligodendrócitos enquanto que na matéria cinzenta se encontra uma mistura de oligodendrócitos e de células NG2. Também foi observada a expressão de Cre em astrócitos protoplasmáticos e em alguns neurónios (Trotter et al., 2010). No entanto, nenhum dos neurónios analisados derivados do cérebro adulto pareceu expressar NG2 ou PDGFR α (Robel et al., 2011).

Assim, parece haver apenas uma parte de células NG2+ no início do desenvolvimento pós-natal que apresenta multipotencialidade intrínseca. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para tentar comprovar que o mesmo ocorre no SNC completamente maduro (Polito e Reynolds, 2005).

(página intencionalmente em branco)

5. Nichos Neurogénicos

A maioria dos tecidos adultos no corpo humano mantem uma reserva de células estaminais, tendo já sido descritos nichos em diversos tecidos como a pele, o fígado e o intestino (Taupin, 2006).

Até há bem pouco tempo, pensava-se no tecido neural como sendo uma exceção a esta regra. Após a descoberta das CEN na ZSV do VL e na ZSG do GD do hipocampo, passou a admitir-se existência de nichos neuronais (Li e Xie, 2005 e Ma et al., 2005). Sendo as interações entre os nichos e as células estaminais de extrema importância para preservar a fisiologia normal de um órgão, realizaram-se inúmeros estudos para a sua melhor compreensão (Suh et al., 2009).

A utilização de animais modelo mais simples proporcionou informação celular e funcional adicional sobre estes microambientes especializados, com evidências crescentes de que estes não só acomodam as CEN como se encarregam da manutenção e da regulação da neurogênese no adulto (Ma et al., 2005 e Jordan et al., 2007).

5.1. Constituição dos Nichos Neurogénicos

São cinco os principais componentes celulares dos nichos neurogénicos: as células endodimais, a astroglia, os descendentes imaturos das CEN, os neurónios maduros e as células endoteliais (Jordan et al., 2007).

5.1.1. Células Ependimais

As células endodimais localizam-se ao longo do sistema ventricular, formando uma barreira entre o líquido cefalorraquidiano e o parênquima cerebral. Encontram-se anatomicamente próximas das CEN e regulam a neuroregeneração através da secreção de moléculas como a proteína Noggin, um antagonista das proteínas morfogénicas do osso (BMP) (Jordan et al., 2007).

A proteína Noggin é produzida pelos astrócitos da ZSV e é um poderoso inibidor da neurogênese que aí ocorre. Ao secretarem a Noggin, as células endodimais asseguram a neutralização dos efeitos inibitórios das BMP, sugerindo que o potencial neurogenerativo pode ser regulado pelo aumento ou diminuição da secreção da Noggin e das BMP (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Estas células estão também envolvidas na migração dos neuroblastos ao longo da CMR. O batimento dos cílios das células parece regular a concentração de moléculas responsáveis pela orientação da migração dos neuroblastos (Jordan et al., 2007).

5.1.2. Astrócitos

Os astrócitos são uma parte integrante e de extrema importância nos diversos passos da neuroregeneração no cérebro adulto. Desempenham diversas funções, desde a regulação da condução de informação e formação de sinapses até à plasticidade do SN, isto é, a capacidade do SN para alterar a sua forma e função, consoante as exigências ambientais (Ma et al., 2005).

Os astrócitos desempenham um papel estrutural e sinalizante no desenvolvimento dos neurónios. Além de formarem a barreira CMR para a migração dos neuroblastos, regulam também a sua velocidade de migração, através do neurotransmissor GABA (Jordan et al., 2007).

Tanto na ZSG como na ZSV o papel dos astrócitos é crítico. Quando se cultivam CEN sob uma camada de astrócitos derivados do hipocampo, estes exercem um papel na determinação do seu destino em neurónios (Suh et al., 2009).

Os mecanismos pelos quais os astrócitos regulam a neurogénese só agora começaram a ser estudados. Veremos mais à frente, com maior detalhe, de que modo certos factores expressos pelos astrócitos, sendo o factor de crescimento do fibroblasto-2 (FGF-2) e o EGF exemplos relevantes, influenciam a neurogénese (Jordan et al., 2007).

5.1.3. Descendentes Imaturos das CEN e Neurónios Maduros

Estudos recentes sugerem a existência de mecanismos de feedback para os progenitores imaturos modularem o comportamento das CEN. Um dos exemplos é a libertação de GABA por parte dos neuroblastos na CMR, com a consequente diminuição na diferenciação das CEN.

Os neurónios maduros são capazes de responder a estímulos exteriores, alterando a taxa da neurogénese. Os interneurónios libertam GABA na ZSG, sendo este neurotransmissor responsável pela activação da maturação e integração neuronal das células granulares. Neurotransmissores como a serotonina, a dopamina e a acetilcolina libertados pelos neurónios maduros mostraram igualmente a sua importância na regulação da neurogénese (Jordan et al., 2007).

5.1.4. Células Endoteliais

As células endoteliais do cérebro encontram-se na superfície interna dos vasos sanguíneos, geralmente acopladas aos astrócitos, e são o componente maioritário da barreira hematoencefálica.

Em 1999, surgiu a primeira evidência do papel desempenhado por estas células na estimulação da neurogénese quando co-culturas de células da ZSV e células endoteliais revelaram um aumento na produção de neurónios. Mais tarde, foi demonstrado que estas células quando cultivadas com as CEN não só inibem a sua diferenciação como estimulam a sua proliferação. Pensa-se que factores solúveis libertados pelas células endoteliais poderão estar envolvidos nesta regulação. Surpreendentemente, as CEN adultas quando em contacto com células endoteliais podem dar origem também a células endoteliais, mostrando que estas não só regulam o nicho, como são capazes, em condições específicas, de repopular o próprio nicho (Ma et al., 2005 e Jordan et al., 2007).

O envolvimento das células endoteliais e astrócitos sugere que factores que controlam a angiogénese podem também controlar a neurogénese. Diversos factores derivados das células endoteliais, como o Notch e o factor derivado do epitélio pigmentado (PEDF), mostraram regular a neurogénese (Jordan et al., 2007).

5.2. Matriz Extracelular

A matriz celular, apesar da sua extrema importância no nicho neurogénico, é ainda largamente desconhecida. Além de fornecer suporte físico ao nicho neurogénico, tem um outro papel crítico, o do recrutamento das moléculas sinalizadoras responsáveis pela regulação da comunicação intercelular. O facto dos diversos factores se encontrarem em concentrações superiores nos nichos, deve-se, em grande parte, à barreira formada pela matriz (Jordan et al., 2007).

Desta forma, a matriz celular, ao balancear a difusão das diferentes moléculas reguladoras, é igualmente responsável pela regulação da neurogénese.

5.3. Nicho Vascular

A estrutura vascular e o SN estão em contacto íntimo durante todo o processo de desenvolvimento embrionário (Suh et al., 2009). Nas zonas germinais, além de se encontrarem anatomicamente associados, as suas funcionalidades estão interligadas,

sugerindo uma relação próxima entre a angiogénese e a neurogénese, em que os factores derivados da corrente sanguínea influenciam as células estaminais (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009 e Suh et al., 2009).

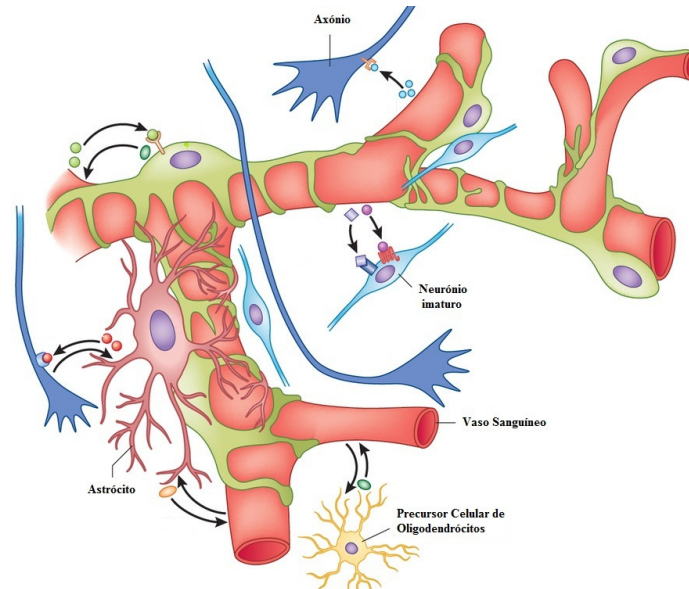


Figura 12: Nicho Neurovascular. Imagem da proximidade anatómica entre os vasos sanguíneos, os astrócitos e os neurónios, no nicho neurogénico. Não sendo um circuito passivo, pelo contrário, os vasos sanguíneos são um tecido rico que regula o processo neurogénico através da secreção de múltiplas moléculas angiogénicas.
(Adaptado de Brumm e Carmichael, 2012)

Os contactos entre astrócitos e vasos sanguíneos são estranhamente permeáveis, podendo servir como reguladores da disponibilidade dos factores provenientes das células endoteliais, dos factores de crescimento e das citoquinas, com o consequente controlo da diferenciação e proliferação das células estaminais (Li e Xie, 2005 e Ming e Song, 2011).

6. Sinalização nos Nichos Neurogénicos

A neurogénese é controlada por diversos estímulos fisiológicos e patológicos. O nicho neurogénico, em resposta a estes estímulos, é capaz de coordenar todos os aspectos de produção de novas células cerebrais (Ma et al., 2005).

Existem diversos factores que influenciam todo o processo neurogénico. Podem ser divididos em factores internos (factores expressos pelas células estaminais e progenitores que controlam as diferentes fases da neurogénese) e em factores externos (produzidos por tecidos vizinhos que actuam nas células estaminais e progenitores) (Suh et al., 2009).

Havendo dezenas de diferentes factores, abordam-se seguidamente os mais relevantes, que, por esse motivo, têm sido mais intensamente estudados quanto à sua funcionalidade.

6.1. Factores Internos

6.1.1. Via de Sinalização Sonic Hedgehog

A Sonic Hedgehog (Shh) é um importante mitogénio envolvido em diversos aspectos da formação do SNC embrionário (Robel et al., 2011). Recentes estudos mostram o seu papel no cérebro pós-natal. Este mitogénio parece estar envolvido na regulação do número de células estaminais existentes, na proliferação dos precursores neurais e na produção de novos neurónios (Palma et al., 2005).

As fontes de Shh no cérebro adulto normal parecem ser os astrócitos. Estes, quando transplantados, induzem a formação de neuroblastos em regiões neurogénicas e não neurogénicas (Christie e Turnley, 2012).

O factor de transcrição de oligodendrócitos 2 (Olig2) é um alvo da sinalização de Shh, sendo expresso em concentrações elevadas pelos neuroblastos. Dado que o aumento de Shh e de Olig2 estimula a proliferação das células estaminais, é necessário que a sua concentração baixe para que haja diferenciação das neuroesferas. A sua contínua expressão mostrou ser um potente inibidor da neurogénese, tanto *in vitro* como *in vivo* (Robel et al., 2011).

A perda de expressão de Shh revela anomalias no GD e no BO enquanto a sua estimulação resulta numa elevada proliferação dos progenitores adultos (Lledo et al., 2006).

6.1.2. Proteínas Morfogénicas do Osso

As BMP constituem a maior subclasse da família de factores de crescimento transformantes beta (TGF- β). No SN em desenvolvimento, as BMP participam na regulação da proliferação e da diferenciação celular. No cérebro adulto, parecem modular a produção de oligodendrócitos, neurónios e astrócitos a partir das CEN (Sabo et al., 2009).

As BMP inibem a proliferação das CEN, com o consequente aumento da neurogénese. No entanto, a longo prazo, tal fenómeno leva a uma depleção do número de CEN (Christie e Turnley, 2012). É, assim, necessário um rigoroso balanço entre a estimulação e a inibição das BMP, de modo a regular o número e a diferenciação das CEN.

Como referido acima, sabe-se que a expressão da Noggin é responsável pela inibição destas proteínas, tendo esta demonstrado, tanto na ZSV como na ZSG, a capacidade para bloquear a transdução de sinal pela via BMP (Sabo et al., 2009). O efeito bloqueador da Noggin prende-se com a sua capacidade de se ligar às BMP no espaço extracelular e, deste modo, impedir a ligação do respectivo receptor de membrana, BMPR. Este modo de acção implica que o resultado final será dependente do balanço das concentrações dos dois intervenientes, Noggin e BMP no espaço extracelular.

As BMP são igualmente responsáveis pelo aumento da expressão e função do Olig2, um promotor da gliogénese. Assim, a inibição das BMP leva a um aumento da expressão de Olig2, provocando uma tendência superior para diferenciação em oligodendrócitos (Robel et al., 2011). Foram realizados testes em que se observou, com a infusão da Noggin, uma redução do número de astrócitos na ZSV, com aumento de oligodendrócitos e remielinização do corpo caloso.

Em modelos animais com danos cerebrais, a Noggin produzida por astrócitos promoveu igualmente a diferenciação em oligodendrócitos, sendo que a desmielinização na ZSV induziu ainda a expressão da Cordina, um outro antagonista de BMP, com indução do destino oligodendrocítico (Christie e Turnley, 2012).

6.1.3. Via de Sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt é um complexo sistema de comunicação celular que funciona através de uma cascata de sinais, activada quando a molécula Wnt se liga ao seu receptor de membrana Frizzled. A activação do receptor através da ligação com o Wnt

parece activar três diferentes vias, sendo a via de sinalização Wnt/ β -catenina a de maior importância no desenvolvimento neuronal.

O bloqueio desta sinalização reduz a neurogénese de CEN no hipocampo *in vitro* e elimina a neurogénese totalmente *in vivo*. A β -catenina mostrou ser também relevante na proliferação das células estaminais e na regulação da taxa de migração. Um aumento da sua concentração provoca um aumento da proliferação, com os consequentes aumentos populacionais e da taxa migracional (Zhang et al., 2011).

A sinalização Wnt é negativamente regulada pelo glicogénio sintase kinase 3 beta (GSK3 β) que fosforila a β -catenina, activando a sua degradação (Christie e Turnley, 2012). Um inibidor da GSK3 β mostrou induzir a diferenciação das células estaminais em neurónios (Zhang et al., 2011).

O aumento da expressão de Wnt3 no GD do ratinho relevou ser suficiente para provocar um aumento da neurogénese, enquanto o bloqueio desta via bloqueou a neurogénese tanto *in vivo* como *in vitro*. A Wnt7A mostrou promover também a proliferação das CEN no adulto, enquanto a depleção do seu gene resulta, *in vivo*, numa diminuição do número de células estaminais (Robel et al., 2011).

6.1.4. Via de Sinalização Notch

A via de sinalização Notch compreende o mecanismo molecular central na regulação do balanço entre a manutenção e a diferenciação das CEN no cérebro adulto.

Em resumo, a sinalização inicia-se com a produção de factores de transcrição (FT) da família bHLH, os activadores de transcrição Mash1 e as neurogeninas (Ngn1/ 2) que induzem a diferenciação neuronal.

Estes FT activam os ligandos dos receptores Notch, as proteínas transmembranares Delta 1 (Dll1) e Jagged1 (Jag1), que, por sua vez, se ligam ao receptor transmembranar Notch das células vizinhas. Na sequência desta ligação, o domínio intracelular (NICD) é libertado e transferido para o núcleo, onde forma um complexo com a proteína RBPj, um regulador de transcrição. Este complexo é um activador transcricional que induz a expressão de repressores transcripcionais bHLH como o Hes1 e Hes5, que reprimem a expressão dos genes proneurais e Dll1, inibindo a diferenciação neuronal. Com o resultado desta sinalização, a célula que expressa o ligando Delta diferencia-se em neurónio (devido à expressão dos FT proneurais) e previne que a célula vizinha que expressa Notch, se diferencie também. Esta célula vizinha permanece indiferenciada e pode dar origem a neurónios mais tarde, quando receber o estímulo apropriado.

A perda de função dos receptores de Notch, Dll1, RBPj e os factores Hes resulta numa prematura diferenciação e rápida depleção de CEN.

Estudos onde se utilizaram ratinhos transgénicos contendo o promotor de Hes5 ou locais de ligação da RBPj revelaram que esta via se encontra activa tanto na ZSV como na ZSG.

Utilizando uma linhagem de ratinhos com expressão induzível pelo tamoxifeno, descobriu-se que, ao eliminar a RBPj das CEN do adulto, dá-se um aumento transitório da proliferação na ZSV e da neurogénese, mas com depleção de CEN a longo prazo. O mesmo estudo mostrou que a depleção do gene RBPj, através do tratamento antimitótico com AraC, leva à extinção das CEN quiescentes na ausência da sinalização de Notch.

Portanto a via de Notch é necessária para a manutenção da quiescência das CEN, enquanto o seu bloqueio promove a diferenciação em neurónios (Imayoshi e Kageyama, 2011).

6.2. Factores Externos

6.2.1. Factor de Crescimento Endotelial Vascular

O factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma das mais importantes proteínas sinalizadoras do processo angiogénico (Jin et al., 2002). Além da sua importância como agente angiogénico, tem funções como a estimulação do crescimento axonal e o prolongamento do tempo de vida dos neurónios em determinadas regiões (Galvan et al., 2006)

Após a sua secreção, este mitogénio interage com os receptores tirosina cinases VEGFR1/Flt1 e VEGFR2/flk1, expressos pelas células endoteliais (Jin et al., 2002 e Galvan et al., 2006).

Em 2002, Kunlin e colegas admitiram a possibilidade de que VEGF possa ser tanto neurogénico como angiogénico. Foi monitorizada a proliferação celular, em presença de VEGF, utilizando o marcador BrdU, *in vitro* e *in vivo*. Observou-se um aumento de células marcadas com BrdU, em ambas as condições, mostrando que o VEGF actua como um estimulador da neurogénese. Aparentemente, os seus efeitos neurogénicos são mediados pela ligação do factor ao receptor VEGFR2/flk1 (Jin et al., 2002).

A migração é também controlada por este factor (Bath e Lee, 2010).

6.2.2. Factores de Crescimento Epidermal e do Fibroblasto 2

Diversos estudos mostram que a utilização concomitante de EGF e de FGF-2 aumenta a taxa neurogénica com o aumento do número de precursores neurais tanto no hipocampo como no hipotálamo. O EGF é o mitogénio mais comumente utilizado na promoção de crescimento e na manutenção de neuroesferas em cultura.

As células tipo C da ZSV são precursores das neuroesferas e expressam o receptor do EGF (EGFR). Quando expostas a EGF, estas células induzem um estado multipotente capaz de gerar células gliais e neurónios (Christie e Turnley, 2012). Trabalhos recentes mostram que a infusão intraventricular de EGF provoca um aumento da proliferação e migração celular. No entanto, no ratinho, a diferenciação é maioritariamente em células gliais e não em neurónios (Bath e Lee, 2010).

Já o factor de necrose tumoral alfa (TNF α) induz a proliferação astrogliar, enquanto a sua sobreexpressão leva a um aumento da expressão dos receptores de EGF *in vivo* (Robel et al., 2011).

O FGF-2 é um mitogénio, igualmente potente, geralmente utilizado em conjunto com o EGF, para induzir a proliferação celular em cultura (Christie e Turnley, 2012). Estudos realizados no cérebro do ratinho mostram que este é expresso pelas células GFAP+ e que os seus receptores (FGFR-1 e FGFR-2) podem ser encontrados nos precursores proliferativos e nas células endoteliais. A infusão intraventricular de FGF-2 provoca um aumento da neurogénese promovendo a proliferação celular, um aumento da sobrevivência e um crescimento das neurites.

A sua função primária parece ser ao nível do ciclo celular, já que a ZSV de um ratinho sem FGF-2 mostrou danos na proliferação celular seguida de convulsões e isquémia (Bath e Lee, 2010 e Christie e Turnley, 2012). A depleção do FGFR1, o maior receptor de FGF-2, provocou uma diminuição da neurogénese no hipocampo (Christie e Turnley, 2012).

6.2.3. Factor Neurotrófico derivado do Cérebro

A sinalização de neurotrofinas é mediada pela interação de factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) com o receptor TrkB, e em menor extensão, pela ligação do factor de crescimento do nervo (NGF) com o receptor TrkA, regulando diversas funções das CEN. No cérebro adulto, os efeitos do BDNF e a expressão de TrkB encontram-se largamente presentes, ao contrário do receptor TrkA.

Os estudos foram focados, assim, no BDNF, ainda que a infusão de NGF mostre promover a sobrevivência de neurónios granulares no período pós-natal.

As neuroesferas derivadas da ZSV expressam TrkB e a adição de BDNF promove um aumento transitório de neurónios novos devido ao aumento da diferenciação e crescimento das neurites. A sua presença é necessária para que as células progenitoras do hipocampo adotem um destino neuronal.

No GD, o TrkB é maioritariamente expresso por neuroblastos maduros mas não pelos neuroblastos em proliferação, corroborando a teoria de que o BDNF é importante para a migração, sobrevivência e integração de novos neurónios (Christie e Turnley, 2012).

O BDNF é um factor chave envolvido na regulação do humor. O *stress*, que pode levar à depressão ou a alterações do humor, diminui os níveis do BDNF, enquanto os antidepressivos provocam o aumento da sua expressão. Coincidentemente, a neurogênese no hipocampo do adulto encontra-se diminuída no animal em *stress* e aumentada no animal sob o efeito de antidepressivos.

Condições que aumentam os níveis do BDNF, como são os casos de uma alimentação equilibrada e de exercício físico, aumentam também a neurogênese na ZSG.

As CEN adultas sem TrkB dão origem a neurónios celulares granulares com defeitos no crescimento das dendrites e na arborização, bem como na formação de sinapses.

Na ZSV, o BDNF promove a diferenciação neuronal e a sobrevivência dos neurónios. A infusão de BDNF nos VL não só aumenta a neurogênese no BO como noutras regiões não neurogénicas (Suh et al., 2009).

7. Neurogénese em Condições Patológicas

Mais de 450 milhões de pessoas no mundo sofrem de doenças mentais (WHO, 2010). Os quadros psicopatológicos que estão associados a estas doenças causam enormes impactos na nossa sociedade e degradam de forma significativa a qualidade de vida dos doentes e das pessoas que os rodeiam. Aliviar os sintomas e as consequências destas condições tem sido um dos principais objectos de estudo da psiquiatria moderna. Os investigadores acreditam que a neurogénese pode ser um novo alvo para a abordagem a esta problemática, sendo que a sua regulação pode prevenir ou mesmo curar estas doenças (Eisch et al., 2008).

A causalidade entre a neurogénese e as doenças mentais está longe de ser entendida, sendo a neurogénese vista não tanto como uma causa, mas como um adjuvante de atenuação dos seus sintomas (Sailor et al., 2006).

7.1. Doenças Psiquiátricas

O hipocampo, uma das áreas mais importantes do cérebro, está profundamente envolvida nas funções da memória, na função cognitiva e na regulação do humor. É particularmente vulnerável ao *stress* crónico e às doenças mentais, sendo que a neurogénese que ali ocorre tem sido alvo de significativo escrutínio por parte da comunidade científica (Jun et al. 2012).

A depressão e a esquizofrenia constituem as mais severas doenças psiquiátricas associadas a alterações neurológicas no hipocampo (Kaneko e Sawamoto, 2009).

7.1.1. Neurogénese na Depressão

A depressão é uma das mais prevalentes doenças psiquiátricas da actualidade, com elevada morbilidade a nível mundial, estimando-se a morte anual de aproximadamente 1 milhão de pessoas por suicídio (Kaneko e Sawamoto, 2009).

Uma teoria proposta foi a de que a diminuição da produção de novos neurónios no hipocampo está relacionada com a patogénese da depressão e que um tratamento antidepressivo eficaz passa obrigatoriamente pelo aumento da taxa neurogénica no hipocampo. Esta teoria apoia-se em diversas evidências clínicas, como sejam o facto de o *stress* suprimir a neurogénese no hipocampo e precipitar a depressão em indivíduos vulneráveis e o facto de a maioria dos antidepressivos, quando administrados

cronicamente, elevar a neurogénese no hipocampo, do mesmo modo que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos são apenas eficazes aquando de tratamento crónico.

Sendo o *stress* crónico um dos principais factores de risco da depressão, a investigação neste domínio, devido à falta de animais modelo fidedignos, decorre à criação de situações de *stress* como forma de induzir comportamentos depressivos (Balu e Lucki, 2009). Foi já demonstrado que o *stress* imposto pode inibir um ou mais passos da neurogénese no hipocampo e diminuir a proliferação celular e a sobrevivência de novos neurónios (Kaneko e Sawamoto, 2009). Outros estudos revelam uma redução no volume do hipocampo em doentes depressivos, estando esta redução co-relacionada com a frequência de episódios depressivos e com a duração do tratamento (Balu e Lucki, 2009 e Kaneko e Sawamoto, 2009).

Porém, estudos realizados *post mortem* não encontraram diferenças na proliferação celular em pacientes com depressão *major* e em pacientes não depressivos. Inicialmente, pensou-se que a disparidade dos resultados obtidos em estudos realizados em ratinhos e em humanos se devia às diferenças biológicas (Kaneko e Sawamoto, 2009). No entanto, várias evidências sugerem que a redução do volume do hipocampo não se deve à diminuição da proliferação celular, mas sim às alterações do número de células gliais e/ou da complexidade dendrítica.

Apesar de a neurogénese no hipocampo não estar necessariamente associada à patogénese da depressão, poderá ser importante nos efeitos terapêuticos resultantes do tratamento com antidepressivos.

Todas as classes de antidepressivos conhecidos promovem a neurogénese no hipocampo dos ratinhos, contribuindo não só para a melhoria da saúde mental, mas também para o aumento significativo da taxa neurogénica no hipocampo (Jun et al., 2012). O tratamento com antidepressivos provoca também o aumento da expressão de factores de crescimento e neurotróficos como o BDNF, o VEGF e o FGF-2. Outros tratamentos com efeito antidepressivo, como é o caso do exercício físico, mostram aumentar também a neurogénese no hipocampo.

Apesar de os efeitos neurogénicos de tratamentos com antidepressivos estarem bem definidos nos ratinhos, existem poucos estudos em espécies mais semelhantes ao ser humano (Balu e Lucki, 2009). No entanto, as evidências são crescentes de que a neurogénese, para além de evitar condições depressivas, parece ser um factor importante na atenuação da depressão quando já instalada, sendo necessário continuar a

investigação para se perceber como se relacionam alterações na neurogénese com alterações benéficas no comportamento de doentes depressivos.

7.1.2. Neurogénese na Esquizofrenia

A esquizofrenia, uma doença psiquiátrica multifactorial que resulta de um complexo conjunto de factores genéticos e ambientais, constitui uma das mais preocupantes psicoses dos nossos dias. Esta doença tem igualmente revelado uma associação íntima com a neurogénese no cérebro adulto.

Em diversos estudos, foi observado que nos doentes esquizofrénicos ocorre uma diminuição importante da proliferação das CEN no hipocampo, acompanhada por alterações da morfologia celular e redução no volume do hipocampo. A reversão deste quadro promove melhorias no comportamento e nos sintomas cognitivos associados à doença (Balu e Lucki, 2009 e Jun et al., 2012).

Outros estudos demonstraram que certos genes associados à esquizofrenia estão envolvidos na regulação da neurogénese adulta. Um dos genes que se encontra corrompido na esquizofrenia é o DISC1. Diversos estudos mostraram que o DISC1 está envolvido em diferentes passos na neurogénese adulta e é responsável por diversas respostas comportamentais. Ratinhos com mutações ao nível do gene DISC1, mostraram, em diferentes experiências, um número reduzido de progenitores neuronais e neurónios imaturos no hipocampo do GD, uma diminuição da plasticidade a curto-prazo do SN e uma diminuição da neurogénese com aumento da resposta com comportamentos depressivos.

Outro gene identificado como um factor de risco da esquizofrenia, foi associado à neurogénese adulta. Ratinhos com falta de NPAS3 apresentam diversas anomalias no desenvolvimento cerebral, como a redução do tamanho do hipocampo anterior, hipoplasia do corpo caloso e aumento dos ventrículos, bem como anomalias comportamentais. Estes ratinhos revelaram uma diminuição da neurogénese em 84% em comparação com ratinhos com NPAS3 funcional, permitindo estabelecer uma ligação directa entre a neurogénese e a esquizofrenia.

Outros estudos mais recentes mostram que animais afectados pela doença apresentam comportamentos anormais acompanhados de uma diminuição da neurogénese no hipocampo. Estas anomalias podem ser revertidas pelo aumento da neurogénese induzido pelo exercício físico, podendo inferir-se que o aumento da neurogénese pode ajudar a curar ou, pelo menos, diminuir os sintomas da esquizofrenia (Jun et al., 2012).

Foram realizados estudos nas regiões neurogênicas do ratinho de modo a determinar os efeitos do tratamento com antipsicóticos na neurogênese no hipocampo (Toro e Deakin, 2007). Os antipsicóticos podem ser classificados em duas classes, típicos e atípicos, atendendo à sua maior ou menor propensão para a produção de efeitos extrapiramidais (Balu e Lucki, 2009). Um desses estudos utilizou um antipsicótico típico, o haloperidol, e observou um aumento da proliferação celular na ZSG; no entanto, esses resultados não voltaram a ser observados em ensaios subsequentes com o mesmo fármaco.

A relação entre os antipsicóticos atípicos e a regulação da neurogênese parece depender da classe do fármaco. Foi observado que o tratamento crônico com certos antipsicóticos atípicos, como a olanzapina, tem efeitos reguladores na neurogênese no hipocampo. Já o antipsicótico atípico clozapina não demonstrou produzir alterações na neurogênese. Estes resultados terão de ser suportados com estudos adicionais, já que os efeitos dos antipsicóticos na neurogênese não foram ainda devidamente suportados (Toro e Deakin, 2007). Apesar das discrepâncias nos resultados, a efectividade dos antipsicóticos parece dever-se ao seu potencial efeito na reversão dos défices na neurogênese no hipocampo (Balu e Lucki, 2009).

7.1.3. Causa ou Consequência?

Quando foram descobertas células estaminais no cérebro adulto, não se imaginou a sua importância no domínio das doenças mentais.

É ainda desconhecido se as alterações na neurogênese do hipocampo são uma causa ou uma consequência de doenças psiquiátricas como a depressão e a esquizofrenia. No entanto, é unânime que a neurogênese no hipocampo tem um papel de extrema importância e que alterações na neurogênese provocam alterações cognitivas, humorais e comportamentais. Pelos dados publicados até hoje, uma redução da neurogênese não parece ser necessária nem suficiente para causar comportamentos depressivos, sendo portanto fundamental compreender mais profundamente as funções da neurogênese no cérebro adulto, de modo a perceber qual o seu papel na etiologia das doenças psiquiátricas.

A maioria dos estudos foi realizada em animais modelo, pelo que se sabe muito pouco do que se passa no cérebro humano, não se podendo extrapolar os resultados obtidos em animais e sendo necessário iniciar estudos paralelos no ser humano. De qualquer forma, os avanços nesta área têm sido imensos num tão curto espaço de tempo.

Estabelecer a relação entre a neurogénese adulta e a etiologia das doenças pode conter a chave para potenciais estratégias no seu tratamento. A neurogénese parece regular os sintomas observados em ambas as doenças, pelo que, assim sendo, as futuras aplicações terapêuticas poderão passar pelo aumento da regulação da neurogénese no hipocampo.

7.2. Neurogénese nas Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são marcadas pela degeneração de certos neurónios e pela deteriorização dos circuitos neuronais (Sailor et al., 2006). Actualmente, ainda não existem tratamentos que permitam prevenir a morte neuronal mas as células estaminais parecem possuir um potencial de tratamento e cura para diversas doenças deste tipo, como o Alzheimer e o Parkinson (Kaneko e Sawamoto, 2009 e Taupin, 2012).

O *stress* e a idade são os dois factores que mais contribuem para a diminuição da neurogénese, sugerindo que a desregulação da neurogénese pode ser um factor principal da neurodegeneração causada pelo avanço da idade. A neurogénese diminui em 80% à medida que a idade avança, sugerindo que a idade afecta diversos passos da neurogénese (Marr et al., 2010).

A recente descoberta da ocorrência de neurogénese no SNC tem implicações na forma de olhar as doenças neurodegenerativas e levanta a possibilidade de que eventuais alterações na neurogénese possam estar na sua origem. A literatura sugere que, em doenças como o Alzheimer e o Parkinson, a proliferação e diferenciação neuronal se encontra alterada.

7.2.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa que mais comumente provoca quadros de demência em jovens e adultos, afectando mais de 35 milhões de pessoas a nível mundial (Phillips et al., 2006).

É caracterizada pela neurodegeneração de múltiplos tipos neuronais em diversas localizações, por acumulação de depósitos de β -amilóide e formação de emaranhados neurofibrilares, acompanhada por um acentuado declínio cognitivo e perda progressiva de memória. As causas da doença incluem diversos factores de risco e mutações genéticas, das quais foram identificadas as mutações no gene da proteína precursora amilóide (APP), no gene presenilina-1 (PSEN-1) e no gene presenilina-2 (PSEN-2) (Taupin, 2012).

Estudos realizados *post mortem* revelaram um aumento da expressão de marcadores de células imaturas neuronais nas regiões do hipocampo (Taupin, 2008b). No entanto, estudos subsequentes revelaram que a maioria destas células encontradas no GD eram, na verdade, não-neuronais, não contribuindo para a neurogénese no hipocampo.

Na doença de Alzheimer, o péptido β -amilóide começa por se depositar no hipocampo, resultando em perda neuronal marcada e em atrofia do hipocampo. Foi demonstrado que o excesso deste péptido afecta a função das células estaminais quando em cultura, induzindo a supressão da proliferação e diferenciação neuronal e promovendo a apoptose (Kaneko e Sawamoto, 2009).

Estudos em animais modelo mostraram um aumento da neurogénese em cérebros com mutações na APP, enquanto outros reportaram a diminuição no GD e na ZSV em ratinhos com deficiências na PSEN-1 e APP.

No entanto, algumas discrepâncias observadas podem ser devidas a limitação nos animais transgénicos, que não sejam representativos do SN humano (Taupin, 2008b).

7.2.2. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra, responsável pela diminuição dos níveis de dopamina e consequente diminuição da sua concentração na região alvo, o corpo estriado. Esta doença afecta geralmente a população acima dos 65 anos e inclui sintomas como a rigidez, o tremor e dificuldades na marcha e nos movimentos em geral (Sailor et al., 2006).

Existem evidências de que os neurónios dopaminérgicos do corpo estriado exercem uma função neurogénica nas células progenitoras neuronais, tanto na ZSV como na ZSG (Marxreiter et al., 2013).

Na maioria dos doentes com Parkinson parece não haver uma associação com mutações genéticas hereditárias. Estudos realizados em animais modelo e no ser humano afectados pela doença demonstraram que a proliferação celular se encontra consideravelmente suprimida. Já no BO parece haver um aumento da concentração de uma subpopulação de neurónios periglomerulares, levando a crer que a diminuição de dopamina promove a diferenciação em neurónios dopaminérgicos (Kaneko e Sawamoto, 2009).

A depleção de dopamina em ratinhos com Parkinson resultou na diminuição em 40% dos precursores proliferativos, em ambas as zonas neurogénicas. A geração de

progenitores neurais na ZSV e na ZSG está igualmente reduzida no cérebro de doentes com Parkinson (Taupin, 2008b).

A enervação dopaminérgica e a dopamina têm um papel na regulação da neurogênese no cérebro dos mamíferos. No entanto, são necessários estudos adicionais devido à controvérsia gerada pelos resultados obtidos, tendo como exemplo um estudo *post mortem* que revelou não haver alteração na proliferação de CEN em pacientes com Parkinson quando comparada com pacientes controlo (Marxreiter et al., 2013).

7.2.3. Neurgénese como Estratégia Terapêutica

O estudo da neurogênese nas doenças neurodegenerativas é ainda um campo com muito por explorar. No entanto os esforços feitos nas últimas décadas levaram a uma possibilidade, ainda controversa, de que a regeneração neural pode ser um importante alvo terapêutico.

A investigação realizada, nos últimos anos, sobre a neurogênese nas doenças degenerativas apresenta diferentes resultados de estudo para estudo, não havendo um consenso geral quanto à causalidade da neurogênese nestas doenças. A disparidade dos resultados pode dever-se à diferença de espécies, de animais modelo e até dos métodos de quantificação de células estaminais utilizados.

No entanto, os resultados indicam que na doença de Alzheimer há, geralmente, uma diminuição da neurogênese, enquanto que na doença de Parkinson apenas ocorrem pequenas alterações no BO.

Dado um envelhecimento progressivo da população, a procura de terapias eficazes no tratamento das doenças neurodegenerativas torna-se cada vez mais crucial. O entendimento dos mecanismos das doenças e dos mecanismos moleculares e celulares reguladores das células estaminais é essencial, podendo a sua neutralização ou estimulação fazer parte de futuras estratégias terapêuticas.

(página intencionalmente em branco)

8. Neurogênese como Alvo Terapêutico

O número de opções terapêuticas existentes para restaurar as funções neurológicas perdidas após lesão ou doença é muito reduzido. A descoberta da capacidade regenerativa do SNC do cérebro adulto trouxe uma nova esperança. A neurogênese, e especificamente as células estaminais, surge como uma nova alternativa, um novo potencial alvo terapêutico no tratamento de doenças neurológicas e psiquiátricas.

Para que tais terapias sejam eficazes, é necessário uma compreensão profunda dos complexos mecanismos das diferentes doenças, sendo de extrema importância desenvolver terapias individualizadas que sejam capazes de guiar as CEN no seu percurso migratório, com posterior diferenciação e integração adequada nos circuitos já existentes (Sailor et al., 2006).

As novas terapias ponderam a estimulação de células estaminais ou precursores neuronais endógenos e a transplantação destes para a reparação do SN (Taupin, 2008b).

Um maior conhecimento dos factores, mecanismos e estímulos externos que influenciam e controlam os diferentes passos da neurogênese, pode contribuir para a possibilidade de influenciar *in vivo* as células estaminais, seja aumentando o seu número, influenciando o seu percurso migratório e região alvo ou mesmo a sua diferenciação. A transplantação poderá ser uma opção igualmente viável, através da proliferação e diferenciação dos precursores em cultura com posterior transplantação. (Gage e Van Praag, 2002)

8.1. Estimulação de Populações Endógenas de Células Estaminais

Na última década foram realizados inúmeros progressos no tratamento de doenças do SNC tirando partido da substituição celular através de células estaminais adultas. As células estaminais endógenas apresentam diversas vantagens como sejam a ausência de problemas éticos (decorrentes da utilização de células fetais e embrionárias) e a eliminação de reacções imunológicas (Lie et al., 2004). Apesar de, em condições normais, a sua proliferação estar restrita a duas regiões, as células estaminais encontram-se ao longo de todo o SNC. Estudos realizados *in vitro* demonstraram, surpreendentemente, que células derivadas de regiões não neurogénicas são igualmente capazes de gerar neurónios, quer sob condições patológicas, quer quando transplantadas em regiões neurogénicas (Singec et al., 2007).

Outros estudos demonstraram um aumento temporário dos precursores proliferativos da ZSV e de neurónios migratórios na CMR, após eventos isquémicos e convulsões. De um modo similar, houve também um aumento da proliferação celular na ZSG após isquémias, convulsões e lesões mecânicas e excitotóxicas com um aumento, em certos casos de 8 vezes, da taxa da neurogénese no hipocampo.

Fallon e seus colegas investigaram os efeitos de TGF α exógena na doença de Parkinson num ratinho modelo. Após a indução da morte dos neurónios dopaminérgicos na substância nigra, administrou-se o TGF α , um mitogénio das células estaminais/progenitores da ZSV no corpo estriado. Após este tratamento, observaram-se melhorias comportamentais, com aparecimento de novos neurónios com fenótipos dopaminérgicos no corpo estriado. É necessário continuar a investigação visto que o aparecimento dos novos neurónios ocorreu noutro lugar que não o da sua morte e que, em condições normais, não se observam neurónios dopaminérgicos no corpo estriado.

Outro estudo realizado por Nakatomi e seus colegas observou os efeitos combinados de FGF-2 e EGF no VL do ratinho adulto após selecção degenerativa do CA1 no hipocampo, com morte dos neurónios piramidais. Nos animais tratados com os factores de crescimento foi observado um aumento da proliferação de progenitores celulares endógenos e um aumento significativo de novos neurónios, com regeneração de aproximadamente 40% dos neurónios piramidais na região CA1. Após 3 meses, foi possível observar a formação de sinapses morfologicamente imaturas com propriedades electrofisiológicas alteradas (Lie et al., 2004).

São necessários mais estudos para verificar se a estimulação de células estaminais endógenas é uma possibilidade terapêutica realista. Apesar de diversos estudos sugerirem que a estimulação das células endógenas contribui para a reparação com integração de novas células em circuitos lesados, é prematuro concluir que a neurogénese equivale à regeneração do circuito.

A adição de novos neurónios em circuitos comprometidos pode não ser benéfica, sendo que o seu recrutamento pode deformar a região afectada com o estabelecimento de ligações erradas nos circuitos já existentes (Singec et al., 2007). É necessário garantir uma integração apropriada, com funções e número semelhantes aos dos neurónios perdidos (Lie et al., 2004).

É indispensável coadjuvar esta técnica com terapias neuroprotectoras, caso contrário também as células estaminais estimuladas serão susceptíveis aos mesmos mecanismos neurodegenerativos (Sailor et al., 2006).

8.2. Transplantação de Células Estaminais

Devido à limitada capacidade de proliferação do SNC a transplantação de células estaminais e precursores neuronais fornece uma abordagem alternativa. As células estaminais podem ser transplantadas localmente ou administradas por via intravenosa. Pensa-se que as injeções sistémicas poderão ser utilizadas no tratamento de doenças neurológicas em que a degeneração se encontre mais difundida (Taupin, 2008a).

A primeira demonstração desta possibilidade surgiu de um estudo realizado num ratinho adulto em que se induziu a apoptose de neurónios piramidais. As CEN transplantadas responderam a este dano, com diferenciação específica neste tipo neuronal e projecção dos seus axónios para a região alvo apropriada (Singec et al., 2007).

Foram já realizados inúmeros estudos com transplantação de CEN de origem embrionária, fetal e adulta, em diversas regiões do SNC. Num destes estudos expandiram-se *in vitro* as CEN do hipocampo de um ratinho adulto em meio com FGF-2 e e transplantaram-se de seguida no hipocampo de um ratinho adulto. As CEN diferenciaram-se em astrócitos e em neurónios maduros com fenótipos correspondentes aos dos neurónios granulares adjacentes. Transplantaram-se também as mesmas CEN na CMR, onde as células migraram de um modo similar ao das derivadas da ZSV e incorporaram o BO como interneurónios (Sailor et al., 2006). Neste caso, torna-se evidente a plasticidade das células, diferenciando-se estas em diferentes fenótipos consoante o local onde são transplantadas.

Outras experiências tentaram abordar o comportamento das células quando transplantadas em modelos animais de doenças. Aparentemente, sob condições patológicas, o SNC dos animais modelo é mais receptível à substituição celular por transplantação.

Numa experiência realizada em ratinhos com a doença de Parkinson, usou-se o transplante de blastócitos indiferenciados no corpo estriado. Quinze semanas após o transplante, observou-se um aumento do número de neurónios dopaminérgicos. Em poucas semanas, verificou-se uma melhoria comportamental, no entanto, 20% dos animais desenvolveram teratomas letais às 7 semanas. Afim de evitar o aparecimento das teratomas, foram transplantadas células com maior grau de diferenciação, tendo sido feita uma cultura com precursores dopaminérgicos adjuvados de diversos factores de crescimento. Em poucas semanas, estes diferenciaram-se em neurónios dopaminérgicos

com maior taxa de sobrevivência, capazes de receber sinais sinápticos e sem formação de teratomas até às 8 semanas. Noutra experiência, usaram-se neurónios dopaminérgicos, verificando-se, além da taxa de sobrevivência muito reduzida, a incapacidade de manutenção do fenótipo dopaminérgico (Sailor et al., 2006).

Estes estudos sugerem a necessidade de estratégias adicionais, e dão ênfase à importância do grau de diferenciação das células transplantadas, sendo que células demasiado indiferenciadas podem provocar a formação de teratomas.

Outra estratégia envolve a alteração genética das células para a secreção de certos factores tróficos com posterior transplantação para os estados iniciais da doença, com o objectivo de aumentar a sobrevivência das células lesadas. Um exemplo que mostra o quão promissora esta técnica aparenta ser, foi um ensaio clínico realizado em doentes com Alzheimer. Neste caso, realizou-se a transplantação de células com expressão aumentada de NGF. Este factor aumenta a sobrevivência de neurónios colinérgicos (especialmente degenerados na doença de Alzheimer). Em apenas 22 meses uma grande população das células permaneceu intacta e a secretar o factor, levando a melhorias cognitivas de 51% (Sailor et al., 2006)!

9. *Considerações Finais*

Os últimos anos testemunharam a queda de um velho dogma e a descoberta de um novo conceito com enormes implicações futuras: a neurogénese continua a ocorrer no cérebro adulto.

A surpreendente plasticidade do SNC maduro demonstra o quão diminuto é o nosso conhecimento actual do cérebro e revela que a capacidade regenerativa do SN é bastante superior ao que se pensava. As possibilidades são imensas, a neurogénese e as CEN adultas contribuem para a possibilidade de descoberta de novas aplicações terapêuticas no tratamento de doenças e lesões do SNC, até hoje, com poucas alternativas.

Dada a potencialidade do SNC em gerar inúmeros fenótipos celulares, as células estaminais representam a promessa de cura para uma variedade de doenças e lesões do SN. Múltiplos estudos indiciam que ambas as técnicas de recuperação do SN lesado poderão vir a ser aplicadas num futuro próximo.

No entanto, algumas considerações terão de ser feitas ao longo de todo o processo de investigação, sendo urgente o aprofundamento do conhecimento das CEN adultas e da neurogénese no adulto.

Uma das perguntas mais centrais é se os novos neurónios, sejam eles obtidos por transplantação ou por estimulação de células estaminais endógenas, contribuem realmente, e não apenas em casos pontuais, para a recuperação funcional e, por fim, para a melhoria dos sintomas e comportamento dos doentes.

Ainda que diversos estudos sugiram a ubíqua presença de células estaminais ao longo de todo o SN, não foi ainda demonstrada a sua capacidade para originar neurónios *in vivo*, ou se, mesmo que possuam esta capacidade, os novos neurónios serão capazes de incorporar, sem danos, os circuitos já existentes.

O potencial de isolamento de progenitores neurais e células estaminais de regiões do cérebro não lesadas do próprio doente poderá vir a proporcionar uma infindável fonte de células estaminais para futura transplantação, eliminando necessidades como a procura de dadores compatíveis e o uso de fármacos supressores do sistema imunitário, aumentando a probabilidade de sucesso de transplantação e respectiva recuperação.

Avanços muito significativos foram já conseguidos, mas é essencial continuar o trabalho e exploração deste tão complexo e maravilhoso mundo que é o cérebro humano.

(página intencionalmente em branco)

Bibliografia

Alvarez-Buylla, A., Seri, B. e Doetsch, F. (2002) "Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain", *Brain Research Bulletin*, **57**(6), pp. 751–8.

Azevedo, C. (2005) "Neurônio", in Lidel Edições Técnicas (Ed.) *Biologia Celular e Molecular*, 4ª edição, pp. 461-475.

Balu, D. T. e Lucki, I. (2009) "Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications and contribution to disease pathology", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **33**, pp. 232–252.

Barani, I. J., Benedict, S. H. e Lin, P.-S. (2007) "Implications for the conventional radiotherapy of central nervous system malignancies", *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **68**(2), pp. 324–333.

Bath, K. G. e Lee, F. S. (2010) "Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis", *Developmental Neurobiology*, **70**(5), pp. 339–49.

Brumm, A. J. e Carmichael, S. T. (2012) "News and Views: Not just a rush of blood to the head", *Nature Medicine*, **18**(11), pp. 1609–1610.

Christie, K. J. e Turnley, A. M. (2012) "Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **6**(70), pp.1-11.

Conover, J. C. e Allen, R. L. (2002) "The subventricular zone: new molecular and cellular developments", *CMLS: Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, pp. 2128–2135.

Doetsch, F. (2003) "The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*" **6**(11), pp. 1127–34.

Eisch, A. J., Cameron, H. a, Encinas, J. M., Meltzer, L. a, Ming, G.-L. e Overstreet-Wadiche, L. S. (2008) "Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype?", *The Journal of Neuroscience*, **28**(46), pp. 11785–91.

Gage, F. H. e Van Praag, H. (2002) "Neurogenesis in the adult brain", in Lippincott, Williams, and Williams (Ed.) *Neuropsychopharmacology: The fifth Generation of Progress*, 4ª edição, pp. 110–117, American College of Neuropsychopharmacology, Filadélfia, EUA.

Galvan, V., Greenberg, D. e Jin, K. (2006) "The role of vascular endothelial growth factor in neurogenesis in adult brain", *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **6**(6), pp. 667–9.

Götz, M. e Huttner, W. B. (2005) "The cell biology of neurogenesis", *Nature Reviews. Molecular cell biology*, **6**(10), pp. 777–88.

Gray, H. "The Skull" in *Anatomy of the Human Body*, Lea & Febiger, Filadélfia, EUA.

Imayoshi, I. e Kageyama, R. (2011) "The role of Notch signaling in adult neurogenesis", *Molecular Neurobiology*, **44**(1), pp. 7–12.

James, R., Kim, Y., Hockberger, P. E. e Szele, F. G. (2011) "Subventricular zone cell migration: lessons from quantitative two-photon microscopy", *Frontiers in Neuroscience*, **5**(30), pp. 1–11.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L. e Greenberg, D. a. (2002) "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(18), pp. 11946–50.

Jordan, J. D., Ma, D. K., Ming, G.-L. e Song, H. (2007) "Cellular niches for endogenous neural stem cells in the adult brain", *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, **6**(5), pp. 336–41.

Jun, H., Mohammed Qasim Hussaini, S., Rigby, M. J. e Jang, M.-H. (2012) "Functional role of adult hippocampal neurogenesis as a therapeutic strategy for mental disorders", *Neural Plasticity*, **2012** (854285).

Kandel, E. R., Schwartz, J. H. e Jessel, T. M. (2000) "Nerve Cells and Behaviour", in McGraw-Hill Companies (Ed.) *Principles of Neural Science*, 4ª edição, pp. 27–39, Center of Neurobiology and Behaviour, College of Physicians and Surgeons of Columbia University and the Howard Hughes Medical Institute, Nova York, EUA.

Kaneko, N. e Sawamoto, K. (2009) "Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions", *Neuroscience Research*, **63**(3), pp. 155–64.

Kee, N., Wilson, N., De Vries, M., Bradford, D., Key, B. e Cooper, H. M. (2008) "Neogenin and RGMA control neural tube closure and neuroepithelial morphology by regulating cell polarity" *The Journal of Neuroscience*, **28**(48), pp. 12643–53.

Kriegstein, A. e Alvarez-Buylla, A. (2009). "The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells" *Annual Review of Neuroscience*, **32**(1), pp. 149–184.

Kriegstein, A. R. e Götz, M. (2003) "Radial glia diversity: a matter of cell fate", *Glia*, **43**(1), pp. 37–43.

Li, L. e Xie, T. (2005) "Stem cell niche: structure and function" *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21**, pp. 605–31.

Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. a, Ming, G. e Gage, F. H. (2004) "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44**, pp. 399–421.

- Lledo, P.-M., Alonso, M. e Grubb, M. S. (2006) "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits", *Nature Reviews. Neuroscience*, **7**(3), pp. 179–93.
- Ma, D. K., Ming, G. e Song, H. (2005) "Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis", *Current Opinion in Neurobiology*, **15**, pp. 514–520.
- Malatesta, P. e Götz, M. (2013) "Radial glia - from boring cables to stem cell stars", *Development*, **140**(3), pp. 483–6.
- Mangin, J.-M. e Gallo, V. (2011) "The curious case of NG2 cells: transient trend or game changer?" *ASN Neuro Review*, **3**(1), pp. 37–49.
- Marr, R. a, Thomas, R. M. e Peterson, D. a. (2010) "Insights into neurogenesis and aging: potential therapy for degenerative disease?", *Future Neurology*, **5**(4), pp. 527–541.
- Marxreiter, F., Regensburger, M. e Winkler, J. (2013) "Adult neurogenesis in Parkinson's disease", *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**(3), pp. 459–73.
- Mendez-Otero, R., Zaverucha-do-Valle, C., Gubert, F., Freitas, G. R. De e Santiago, M. F. (2005) "Regulation and function of neurogenesis in the adult vertebrate brain", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**(10), pp. 1553–9.
- Ming, G. e Song, H. (2005) "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system", *Annual Review of Neuroscience*, **28**, pp. 223–50.
- Ming, G.L. e Song, H. (2011) "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions", *Neuron*, **70**(4), pp. 687–702.
- Nishiyama, A; Komitova, M.; Suzuki R; e Zhu X (2009) "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity", *Nature Reviews Neuroscience*, **10**, pp. 9–22.
- Palma, V., Lim, D. a, Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Álvarez-Buylla A. e Ruiz i Altaba, A. (2005) "Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain", *Development*, **132**(2), pp. 335–44.
- Phillips, W., Michell, A. W. e Barker, R. A. (2006) "In Focus : Neural Stem Cells. Neurogenesis in Diseases of the Central Nervous System", *Stem cells and Development*, **15**, pp. 359–79.
- Pinto, L. e Gotz, M. (2008) "Glial Cells as the Source of Neurons and Glia in the Developing and Adult CNS", *Journal of Medical Sciences*, **1**(3), pp. 114–128.
- Polito, A. e Reynolds, R. (2005) "NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system", *Journal of anatomy*, **207**(6), pp. 707–16.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O. e William, S. M. (2004), "Neural Signaling", in Sinauer Associates (Ed.), *Neuroscience*, 3ª edição, pp. 1–188, Massachusetts, EUA.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O. e William, S. M. (2004), "Changing Brain", in Sinauer Associates (Ed.), *Neuroscience*, 3ª edição, pp. 301–612, Massachusetts, EUA.

Rao, M. S. e Jacobson, M. (2005). "Making a Neural Tube: Neural Induction and Neurulation" in Kluwer Academic/ Plenum Publishers (Ed.) *Developmental Neurobiology*, 4ª edição, pp. 1-20. Nova York, EUA.

Reynolds, B. A. e Weiss, S. (1992) "Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System", *Science*, **255**(5052), pp. 1707 – 1710.

Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B. e McKenzie, I. (2011) "NG2-glia as multipotent neural stem cells - fact or fantasy?", *Neuron*, **70**(4), pp. 661–673.

Robel, S., Berninger, B. e Götz, M. (2011) "The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis", *Nature reviews. Neuroscience*, **12**(2), pp. 88–104.

Sabo, J. K., Kilpatrick, T. J., Cate, H. S. (2009) "Effects of bone morphogenic proteins on neural precursor cells and regulation during central nervous system injury" *Neuro-Signals*, **17**(4), pp. 255–64.

Sailor, K. a, Ming, G.-L., e Song, H. (2006) "Neurogenesis as a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases", *Expert Opinion on Biological Therapy*, **6**(9), pp. 879–90.

Singec, I., Jandial, R., Crain, A., Nikkhah, G. e Snyder, E. Y. (2007) "The leading edge of stem cell therapeutics" *Annual review of medicine*, **58**, pp. 313–28.

Smith, C. U. M. (2002) "Introductory Orientation" in *Elements of Molecular Neurobiology*, 3ª edição, pp. 1–16. John Wiley & Sons, Ltd, Birmingham, RU.

Smith, C. U. M. (2002) "Epigenetics of the Brain" in *Elements of Molecular Neurobiology*, 3ª edição, pp. 437–476. John Wiley & Sons, Ltd, Birmingham, RU.

Suh, H., Deng, W. e Gage, F. H. (2009) "Signaling in adult neurogenesis", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **25**, pp. 253–75.

Taupin, P. (2006) "Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy", *Stem Cell Rev*, **2**(3), pp. 213-9.

Taupin, P. (2008a) "Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells", *International Journal of Medical Sciences*, **5**(3), pp. 127–32.

Taupin, P. (2008b) "Adult neurogenesis pharmacology in neurological diseases and disorders" *Expert review of neurotherapeutics*, **8**(2), pp. 311–20.

Taupin, P. (2012) "Adult Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Therapies", *Advances in Stem Cell Research*, **18**, pp. 383–393

Teter, B. e Ashford, J. W. (2002) "Neuroplasticity in Alzheimer's disease", *Journal of Neuroscience Research*, **70**(3), pp. 402–37.

Toro, C. T. e Deakin, J. F. W. (2007) "Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development?", *Schizophrenia Research*, **90**(1-3), pp. 1–14.

Trotter, J., Karram, K. e Nishiyama, A. (2010) "NG2 cells: Properties, progeny and origin", *Brain research reviews*, **63**(1-2), pp. 72–82.

Vander, A., Sherman, J. e Luciano, D. (2006) "Sinalização Neuronal e Estrutura do Sistema Nervoso", in Guanabara Koogan (Ed.) *Fisiologia Humana: os Mecanismos das Funções Corporais*, 9ª edição, pp. 144-196.

Wynshaw-Boris, A., Pramparo, T., Youn, Y. H., and Hirotsune, S. (2010) "Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies" *Seminars in cell and developmental biology*, **21**(8), pp. 823–30.

Zhang, H., Zhang, X., Bie, P., Miller, R. H. e Bai, L. (2013) "Adult NG2-Expressing Cells in Multiple Organs: A Novel Progenitor in Regenerative Medicine", *Journal of Genetic Syndromes and Gene Therapy*, **04**(03), pp. 1–10.

Zhang, L., Yang, X., Yang, S. e Zhang, J. (2011) "The Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis", *The European journal of neuroscience*, **33**(1), pp. 1–8.

WHO: World Health Organization (2010) "Mental health: strengthening our response", última actualização em 2010 [Consultado em 10.10.13]

Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs220/en/>

(página intencionalmente em branco)